

# イネばか苗病の育苗期間中における感染動態および防除技術の開発

著者	越智 昭彦
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18162号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00122659">http://hdl.handle.net/10097/00122659</a>

イネばか苗病の育苗期間中における感染動態

および防除技術の開発

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

越智 昭彦

指導教員 高橋 英樹 教授

## 目 次

第1章 緒言 .....	2
第2章 育苗期間におけるばか苗病の感染動態 .....	6
I 各育苗工程におけるばか苗病の感染調査 .....	6
II 播種前の育苗箱からのばか苗病菌の検出 .....	18
III 出芽後の育苗器からのばか苗病菌の検出 .....	25
第3章 プラズマ照射によるばか苗病汚染種子の殺菌 .....	30
I プラズマ照射による発病抑制効果 .....	30
第4章 温湯浸法の代替技術および育苗工程の衛生管理技術の開発 .....	46
I 過熱水蒸気を利用した温湯浸法の代替技術 .....	46
II 種子浸漬水槽の衛生管理による感染抑制技術の開発 .....	57
総合考察 .....	64
摘要 .....	69
引用文献 .....	71

## 第1章 緒言

ばか苗病は水稻の主要病害のひとつで、糸状菌の *Fusarium fujikuroi* による種子伝染性の病害である。病原の *F. fujikuroi* はカビ毒としてジベレリン酸を産生し、感染および発症した水稻苗の茎葉に異常徒長をおこすことが知られており、本病による減収割合は、日本、インドおよびタイでそれぞれ、20～50 %、15%および 3.7 %と報告されている (Webster & Gunnell, 1992)。また国内の水稻生産現場では、本病の発生苗を本田へ移植しないよう指導されているため、本病が多発した場合、育苗箱単位での廃棄および健全苗の再購入を要するため、経済的負担の大きい重要病害として認識されている。

本病に対する一般的で有効な種子消毒法は化学合成農薬の使用であるが、近年の環境保全型農業の普及拡大をうけ、有機栽培および特別栽培などの農薬成分の使用回数に制約のある栽培体系を実施している生産者の多くは、農薬の代替として温湯浸法を採用している。温湯浸法は 60 °C の湯に種子を 15 分間浸漬する熱を利用した殺菌手法として開発され (早坂ら, 1999)、その後全国へと普及拡大した (岡部ら, 2009)。温湯浸法のシェアは山形県で約 3 割 (2014 年)、宮城県で 7 割 (笹原, 2013) など、自治体によって種子消毒の基幹技術となっているが、近年、ばか苗病を対象とした防除において複数の課題が生じている。

この温湯浸法に関連する課題のうち、ここでは以下の 4 点を研究対象とした。1 点目の課題は温湯浸法を採用している育苗施設におけるばか苗病の多発である。近年、温湯浸法の普及に伴い、特定の育苗施設で例年ばか苗病が多発する事例が報告されている (笹原, 2013)。この要因として、種子消毒後にも防除効果が継続する化学合成農薬と異なり、熱が殺菌源の温湯浸法では消毒後の種子は病原体に対して無防備であることから、育苗期間中における再感染が疑われている (笹原, 2013、鈴木, 2017)。新たな防除対策を講じるうえで、育苗期間における感染時期および感染源の特定は不可欠であるが、一般的な育苗工程は、浸種、催芽、出芽、温室での育苗管理と多岐にわたり、全期間が 1 ヶ月程度と長期間であることから詳細な調査は実施されていない。そこで、本研究では過去にばか苗病が多発した温湯浸法を採用している育苗施設を対象とし、その全育苗期間にわたって本病の感染が生じている育苗工程および感染源の特定を試みた。

2 点目の課題は温湯浸法の補完防除技術の開発である。上述のとおり、温湯浸法は、ばか苗病に対して 60 °C で 15 分間の処理条件として開発されたが、50 °C で 10 分間や

60℃で5分間など、殺菌強度が低い場合に病原体が残存することが報告されている（早坂ら, 1999）。一般的な生産現場では温湯浸法の繁忙期は3月で、気温の低い時期に実施されることから、処理前の水稻種子は低温の状態である。これら種子を大量に温水槽へと投入すると顕著に水温が低下することから、想定した防除効果が得られない可能性がある。ばか苗病は種子消毒が不十分な場合に多発することが知られており（林ら, 2002）、生産現場からは安定した苗生産のため、温湯浸法を補完する新たな種子消毒技術が求められている。そこで、本研究では、生物学的および化学的な除染作用（Laroussi *et al.*, 2000）、消毒作用（Shimizu *et al.*, 2010）および細胞の活性作用（Sasaki *et al.*, 2014）が報告されている低温大気圧プラズマを殺菌源とする温湯浸法の補完防除技術の開発を試みた。

殺菌源として利用するプラズマは固体、液体、気体と異なる物質の第四の状態と考えられている。電子の雲であるプラズマは陽イオン、陰イオンおよび中性種の生成および気体と異なる反応を示す（Luo *et al.*, 1998）。また、低温の大気圧プラズマは周辺大気とほぼ同じ圧力のプラズマの一種であり（Tendero *et al.*, 2006）、外気に由来する本プラズマ中には多様な原子、分子、イオンおよび活性酸素が存在する。大気圧プラズマは抗菌活性を持つ活性酸素を生成することから、農産業および食品産業では収穫後の農作物の表面殺菌に利用されている（Hayashi *et al.*, 2014）。一例として、*Aspergillus flavus* のような微生物は、収穫後の農作物表面でヒトの健康を害するカビ毒を産生することから（Benett & Klich, 2003、Richard, 2007）、プラズマ照射による表面殺菌は健康被害のリスク低減に有効と考えられている。

プラズマを利用した植物病害の防除についてはすでに報告があり、病原の *Cladosporium fulvum* を接種したトマト種子の腐敗割合は、プラズマの照射時間によって低減が見られた（Lu *et al.*, 2014）。しかしながら、本報告ではプラズマ照射が種子発芽に与える直接的な影響について言及していない。殺菌効果を重視する収穫後の農作物の表面殺菌と異なり、種子消毒へのプラズマの応用には、種子の発芽に影響せず病原体の防除が可能な処理条件を明らかにする必要がある。そこで、本研究では従来の温湯浸法後に補完防除としてプラズマ照射をおこなう体系防除法の開発を目的とし、プラズマ照射のばか苗病に対する防除効果および種子発芽への影響について検討した。

3点目の課題は温湯浸法のコスト低減である。温湯浸法には単位あたりの種子処理量が数 kg の個人用から、80 kg の大型施設用（黒田ら, 2005）など、多用な専用装置が開

発されているが、一般的に普及しているこれらの装置は処理単位ごとに種子の入れ替えが必要で連続的な消毒処理ができない。また、一般的な温湯浸法の処理時間は 10 分以上と比較的長く、種子消毒の業務を長期化する要因となっている。特に、大量の種子を管理する大型施設では、育苗開始の一ヶ月以上前から温湯浸法を開始する必要があり、人件費増加の一因となっている。さらにこのような大型施設では、温湯浸法後の種子を出荷するまでに数ヶ月間の貯蔵期間を伴う。このため、種子の発芽率を維持するために温湯浸法後に脱水および乾燥の 2 工程が必要となり、さらなる作業時間およびコスト増加の要因となっている (洞口ら, 2008)。そこで、本研究では低コストの温湯浸法の代替技術開発を目的として、過熱水蒸気を殺菌源とする種子消毒法の開発をおこなった。

過熱水蒸気は沸点温度よりも高温に加熱した水蒸気で熱伝導性が高く、焙煎、殺菌、乾燥等の作用を持つことから、すでに食品加工産業等で広く利用されている (伊與田と井上, 2014)。本法ではこの過熱水蒸気および高温空気の混合気体を種子に曝露し、その湿熱によって短時間で種子を加熱および殺菌する機構を利用した。本機構を水稻種子消毒に応用するため、農研機構生物系特定産業技術研究支援センター (以下、生研センター) は 2010 年から種子消毒の試作機開発を実施している。著者は本試作機の防除効果等の実用性および過熱水蒸気の適切な処理条件 (処理温度、曝露時間など) を評価し、試作機の改良を共同で実施してきた。ここでは、これまでの 4 回の試作機開発を経て、製作された実用機であるフィーダ方式 4 号機について、ばか苗病に対する防除効果、種子発芽および苗生育に与える影響の実証試験を行った。

4 点目の課題は、育苗工程の浸種および催芽期間中におこなう追加防除法の開発である。上述のとおり熱を殺菌源とする温湯浸法は、農薬と異なり消毒後の種子には病原体に対する防除効果がない。そのため、温湯浸法を採用している育苗施設では、育苗の最初の 2 工程である浸種および催芽期間中にばか苗病の感染が生じている可能性があり (笹原, 2013)、その一因として空気を含む育苗施設の環境中からの病原体混入が懸念されている (鈴木と宮野, 2017)。浸種および催芽の処理は、同一の水槽内で大量の種子を浸漬することから、水槽内の水に病原の汚染が生じた場合、浸漬している種子全体に感染が拡大する可能性がある。よって、生産現場からは本感染リスクの回避および健全苗の安定生産のため、これら育苗工程における追加防除法の開発が求められている。そこで、本研究では温湯浸法との体系処理を前提とした浸種および催芽時の衛生管理技術の

開発を試みた。ここでは衛生管理の機構として、循環式にした水槽に UV 処理またはフィルターろ過機能を追設した試作装置を用い、ばか苗病に対する防除効果を検討した。本装置で利用する UV 光源は波長 184.9 nm および 254 nm の 2 種を照射する。本光源の殺菌作用は波長 184.9 nm の UV を水に照射することで生成するヒドロキシルラジカルの有機物分解能 (Peng *et al.*, 2015) および、波長 254 nm の UV を直接的に曝露することで得られる有機物分解能 (Haider *et al.*, 2002) に依存する。もう一つの衛生管理機構であるフィルターろ過では、病原体 (小分子: 5-12 × 1.5-2.5 μm) よりも目合いの小さい 1 μm のフィルターによる物理的な病原体の除去をねらいとした (Karov *et al.*, 2009)。本研究では、これら浸種および催芽時における防除機構のばか苗病に対する防除効果および種子発芽への影響を明らかにすることを目的とした。

## 第2章 育苗期間におけるばか苗病の感染動態

### I 各育苗工程におけるばか苗病の感染調査

#### 緒言

近年、種子消毒に温湯浸法を採用している育苗施設の一部では、例年ばか苗病が多発する事例が報告されており（笹原, 2013）、山形県でも同様の栽培体系を実施している生産現場で本病が常発化し、ほぼすべての苗が移植不能となる被害が問題となっている。本病の発生要因として、汚染種子の使用が報告されているが（鈴木ら, 2013）、山形県の事例では、同一の種子生産施設に由来する種子を使用したのにも関わらず、ばか苗病の発生状況は個々の施設によって異なり、その被害状況は、未発生から甚発生と極端な差が見られる。このような発生程度の違いは宮城県でも報告されており、従来、種子伝染性病害とされてきたばか苗病には、汚染種子以外の発生要因が育苗期間中に存在することが示唆されている（笹原, 2013）。一方で、実際の生産現場で感染の生じている育苗工程は不明で有効な防除対策は開発されていない。

今後の防除対策を講じるうえで、育苗期間中の感染動態を明らかにすることは不可欠であることから、本節では、ばか苗病の感染が生じている育苗中の工程を明らかにすることを目的とし、山形県内で温湯浸法を採用している育苗施設を対象に、浸種、催芽、出芽および育苗の4工程について、病原の感染の有無を調査した。

#### 1. 材料と方法

##### (1) 調査地点

調査は、過去にばか苗病の多発事例があり、種子消毒に温湯浸法を採用している山形県内の育苗施設延べ4施設を対象に2013年から2015年の3ヵ年に実施した。なお、いずれの育苗施設も育苗工程は浸種、催芽、出芽および育苗の4工程から構成されている。

##### (2) 検体の処理および育苗

2013年および2014年は育苗工程を浸種、催芽、出芽から育苗（2.5葉期まで）の3時期について、2015年は出芽から育苗をさらに二つに分割した浸種、催芽、



出芽、育苗 (2.5 葉期まで)の計 4 つの育苗工程を調査対象とした (表 1)。

表1 調査地点および調査育苗工程

調査年	調査地点	調査育苗工程				
		浸種 <sup>1)</sup>	催芽 <sup>2)</sup>	出芽～育苗 <sup>3)</sup>	出芽 <sup>4)</sup>	育苗 <sup>5)</sup>
2013	A	○	○	○	-	-
	B	○	○	○	-	-
	C	○	○	○	-	-
	センター	○	○	○	-	-
2014	A	○	○	○	-	-
	B	○	○	○	-	-
	C	○	○	○	-	-
	センター	○	○	○	-	-
2015	A	○	○	-	○	○
	B	○	○	-	○	○
	D	○	○	-	○	○
	センター	○	○	-	○	○

○：調査、－：未調査、センター：山形県農業総合研究センター（対照区）

<sup>1)</sup>浸種開始～浸種終了時

<sup>2)</sup>催芽開始～催芽終了時

<sup>3)</sup>出芽開始～本葉2.5葉期

<sup>4)</sup>出芽開始～出芽終了時

<sup>5)</sup>育苗開始～本葉2.5葉期

感染時期の確認は、各調査地点におけるそれぞれの育苗工程の開始時に、山形県農業総合研究センター（以降、農研センター）にて衛生的に管理した種子または苗を持ち込み、各工程の終了時に回収した検体におけるばか苗病の感染の有無を調査することで実施した。なお、いずれの調査にも前年度産の健全な「はえぬき」種子を供試し、ばか苗病の検出は以下のようにおこなった。

浸種工程（浸種開始～浸種終了）の調査では、農研センターで温湯浸法（60℃、10分間）をおこなった供試種子 20 g をメッシュバックに封入して、調査地点あたり 1 袋を各育苗施設に持ち込み、現地の浸種水槽に慣行管理の水稻種子とともに、浸種開始から終了時まで浸漬処理した。浸種終了時に回収した種子は、滅菌した市販育苗培土を充填した 50mL 容の遠沈管を苗床として任意の種子 96 粒（2013 年）、100 粒（2014 年）または 150 粒（2015 年）を播種し、25℃、明期 14 時間の人工気象器（光強度  $171.43 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、LPH-240SP; Nippon Medical & Chemical Instruments Co.）で 2.5 葉期まで育苗した。

催芽工程（催芽開始～催芽終了）の調査では、浸種工程と同様にメッシュバックに封入した種子を農研センターの衛生管理条件下で 10℃の滅菌蒸留水で各育苗施設と同期間浸種処理し、催芽開始時に、それぞれの現地の催芽水槽に慣行管理の水稻種子とともに、催芽開始から終了時まで浸漬処理した。催芽終了時に農研センターへ回収した種子は、浸種工程の調査と同様に、2.5 葉期苗まで育苗管理した。

出芽工程（出芽開始～出芽終了）の調査では、農研センターの衛生条件下で浸種（10℃、10日間）および催芽処理（30℃、24時間）した種子 100 g を、滅菌した市販育苗培土を充填した慣行の育苗箱に播種し、各育苗施設の出芽開始時に持ち込み、現地慣行の育苗箱とともに出芽処理をおこなった。供試した育苗箱は各育苗施設あたり 1 枚（2013、2014 年）または 3 枚（2015 年）で、各育苗箱は出芽終了時に農研センターへ回収し、プール育苗にて 2.5 葉期まで管理した。

育苗工程（出芽開始～2.5 葉期）の調査では、出芽工程と同様に作製した育苗箱を農研センターの育苗器（INX-180, 株式会社タイショー）内で出芽処理（30℃、2日間）したのち、育苗施設あたり 1 枚（2013、2014 年）または 3 枚（2015 年）を出芽終了時に持ち込み、現地慣行の育苗箱とともに育苗管理して、2.5 葉期に農研センターへ回収した。

また、出芽開始～2.5 葉期の調査では、出芽工程と同様に持ち込んだ検体を 2.5 葉期に回収した。

### (3) 回収した検体におけるばか苗病の感染の確認

#### 1) 単離および同定

各調査地点から回収した検体におけるばか苗病の感染の有無を調査するため、それぞれの 2.5 葉期苗から *Fusarium* 属菌の単離および系統解析による同定をおこなった。菌株単離は、上述のとおり育苗管理した 2.5 葉期苗を対象とし、浸種および催芽工程では供試したすべての種子、また、出芽および育苗工程では育苗箱あたり任意の苗 100 本 (2013、2014 年) または 150 本 (2015 年) について、葉鞘基部から 5 mm 長の切片を切り出し、70%エタノールで 10 秒間浸漬して表面殺菌し、滅菌蒸留水で 3 回リンスしたのち、*Fusarium* 属菌の選択培地である Fo-G2 培地 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g; KCl, 0.5 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g; ammonium citrate dibasic, 2 g; econazole nitrate, 5 mg (dissolved in 0.5 ml of dimethyl sulfoxide); H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.5 g; trace element solution, 0.2 ml; chloramphenicol, 0.25 g; and agar, 20 g per 1 L of distilled water. After autoclaving for 15 min at 121 °C, L-sorbose, 20 g; 25 % iminooctadine triacetate solution, 0.05 ml; and 50 % tolclofos-methyl wettable powder, 1 mg (suspended in a small amount of distilled water)) に置床した(Nishimura, 2007)。これを 25℃の暗条件とした人工気象器で 7 日間培養後、発生したコロニーから菌株を単離した (図 1)。

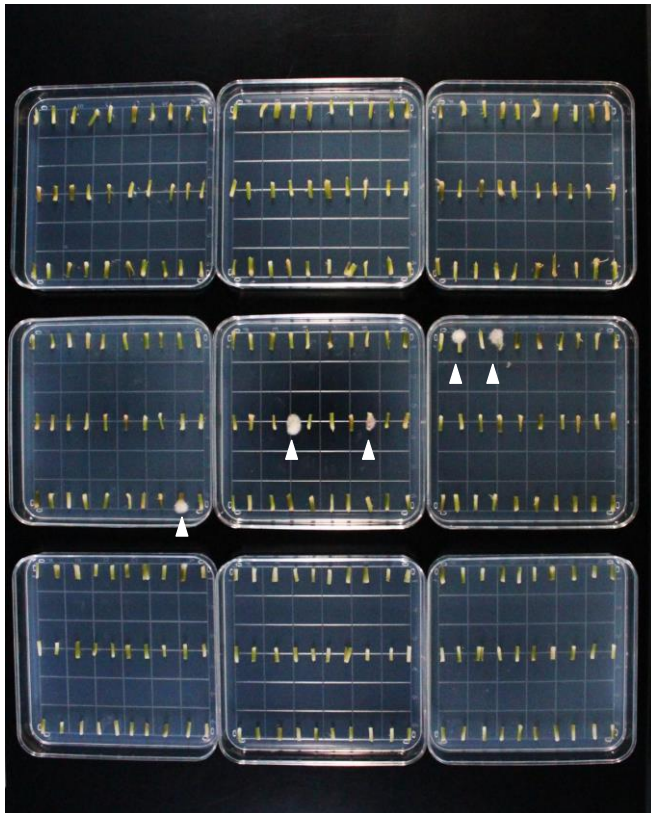


図1 選択培地を用いた苗の葉鞘部からの菌株の単離方法

各調査地点から回収した供試種子または苗を衛生条件下で2.5葉期まで育苗管理し、各苗の葉鞘地際から5 mm程度の切片を作成した。各切片は表面殺菌後にFo-G2培地上に置床および培養(25℃、7日間)した(図は2013年に調査した催芽工程の検体の一部)。矢印は発生した菌株コロニーを示す。

上段：調査地点A、中段：調査地点B、下段：調査地点C

単離した菌株の同定は *Fusarium* 属菌の分類に有用な *TEF1- $\alpha$*  領域の遺伝子配列を用いておこなった。*TEF1- $\alpha$*  は *Fusarium* 属菌において単一のコピーとして生じる多型性の高い配列であることから、分類学的研究に有用である (Geiser *et al.*, 2004)。PDA 培地で培養した (20 °C、7 日間) 菌株より抽出した DNA の *TEF1- $\alpha$*  領域の PCR による増幅は、Cumagun *et al.* (2011) を参考に、PCR 反応液の組成は、10 ng の菌株 DNA、1×Go-Taq バッファー (各 dNTP を 0.2 mM 含有)、1 mM MgSO<sub>4</sub>、0.5  $\mu$ M のプライマー TEF1(5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') および TEF2(5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3')、1 U Go-Taq DNA ポリメラーゼ (Promega) とした。PCR 条件は 92 °C 2 分間のホットスタートの後、95 °C 40 秒、63 °C 40 秒、72 °C 1 分間の 35 サイクルでおこなった。PCR 産物の検出はアガロースゲルを用いた電気泳動でおこない、DNA 精製には NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) を用いた (Sambrook & Russell, 2001)。

DNA 精製産物の塩基配列は、マニュアルに従って PRISM 3730 DNA Analyzer Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems) で決定し、部分配列の相同性は FUSARIUM-ID v.1.0 で確認した (Geiser *et al.*, 2004)。

また、単離菌株のイネに対する病原性の有無を確認するため、以下のように接種試験および再分離をおこなった。温湯浸法 (60 °C、15 分間) で種子消毒した「はえぬき」の健全種子を、滅菌蒸留水で浸種 (10 °C、7 日間) および催芽 (30 °C、24 時間) 処理した後、滅菌した市販育苗培土 20 mL を充填したポリスチレン容器 (44×44×15 mm) に 5 粒を播種した。これに 200 倍のユニコナゾール P 水溶液 7 mL を添加後、各菌株の孢子懸濁液を容器当たり 1 mL 接種した。孢子懸濁液は、PDA 培地 (BD Difco) で 25 °C、暗条件下で 7 日間培養し、適量の滅菌蒸留水を加えたのち、毛筆で培地表面の菌糸をかきとり、不織布 (Merck Millipore) でろ過し、菌密度を 10<sup>6</sup> 個/mL に調整したものを接種した。接種後は 16 時間日長 (30 °C: 20 °C) の人工気象器内で、2.5 葉期まで育苗し発病の有無から病原性を判断した。なお、対照として孢子懸濁液の代わりに滅菌蒸留水を 1 mL 添加した区を設けた。

接種試験で発病が認められた苗からの菌株の再分離は以下の方法で実施した。すなわち、上述の菌株単離と同様に、葉鞘基部の 5 mm 切片または不発芽種子を表面殺菌後に Fo-G2 培地に置床し、25 °C の人工気象器で 10 日間培養した。本再分離試験

の菌株あたりの検体数は播種した 5 粒すべてとし、うち 1 検体以上から *Fusarium* 属菌に特異的な褐色コロニーが発生したものを陽性と判断した。

## 2. 実験結果

各調査地点で所定の育苗工程で管理した供試苗から Fo-G2 培地を用いて菌株を単離し、これらの菌株から抽出した鋳型 DNA を TEF1 および TEF2 のプライマーセットで遺伝子増幅および電気泳動したところ、既知の *F. fujikuroi* 菌株 (Ka52 株、Maff244851) と同じ位置にバンドが確認された (図 2-4)。

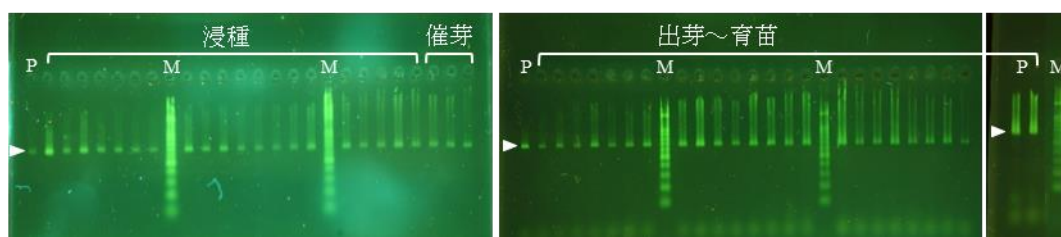


図 2 TEF 1 および TEF2 プライマーセットで遺伝子増幅した単離菌株の電気泳動写真 (2013 年)

2013 年の現地調査で得られた各単離菌株から DNA を抽出し、*F. fujikuroi* の種同定に有用な *TEF1-α* 遺伝子領域を PCR で増幅した。図は TEF 1 および TEF2 プライマーセットで PCR 増幅した *TEF1-α* 遺伝子領域の電気泳動写真。

浸種: 浸種開始～浸種終了時まで供試した検体から単離 (調査地点 B: 20 菌株)

催芽: 催芽開始～催芽終了時まで供試した検体から単離 (調査地点 B: 3 菌株)

出芽～育苗: 本葉 2.5 葉期まで供試した検体から単離 (左から、調査地点 A: 12 菌株, B: 9 菌株, C: 3 菌株)

P: *F. fujikuroi* Ka52 株 (MAFF244851) 、矢頭: 662 bp

M: DNA マーカー (100 bp DNA Ladder, タカラバイオ株式会社)

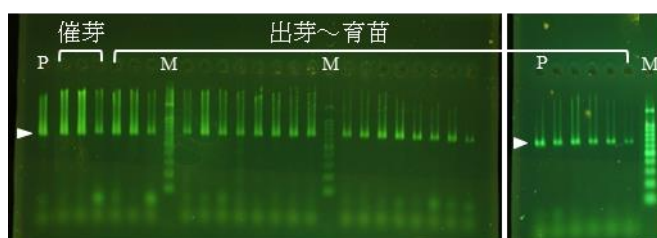


図 3 TEF 1 および TEF2 プライマーセットで遺伝子増幅した単離菌株の電気泳動写真 (2014 年)

2014 年の現地調査で得られた各単離菌株から DNA を抽出し、*F. fujikuroi* の種同定に有用な *TEF1-α* 遺伝子領域を PCR で増幅した。図は TEF 1 および TEF2 プライマーセットで PCR 増幅した *TEF1-α* 遺伝子領域の電気泳動写真。

催芽: 催芽開始～催芽終了時まで供試した検体から単離 (調査地点 B: 3 菌株)

出芽～育苗: 本葉 2.5 葉期まで供試した検体から単離 (左から、調査地点 A: 7 菌株, B: 9 菌株, C: 8 菌株)

P: *F. fujikuroi* Ka52 菌株 (MAFF244851) 、矢頭 : 662 bp

M: DNA マーカー (100 bp DNA Ladder, タカラバイオ株式会社)

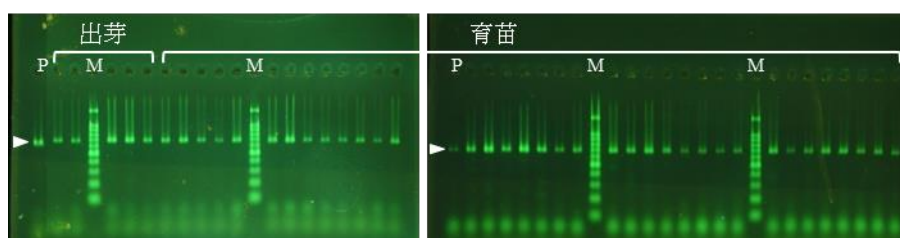


図 4 TEF 1 および TEF2 プライマーセットで遺伝子増幅した単離菌株の電気泳動写真 (2015 年)

2015 年の現地調査で得られた各単離菌株から DNA を抽出し、*F. fujikuroi* の種同定に有用な *TEF1-α* 遺伝子領域を PCR で増幅した。図は TEF 1 および TEF2 プライマーセットで PCR 増幅した *TEF1-α* 遺伝子領域の電気泳動写真。

出芽: 出芽開始～出芽終了時まで供試した検体から単離 (左から、調査地点 A: 1 菌株, B: 3 菌株, D: 1 菌株)

育苗: 育苗開始～本葉 2.5 葉期まで供試した検体から単離 (左から、調査地点 A: 36 菌株)

P: *F. fujikuroi* Ka52 菌株 (MAFF244851) 、矢頭 : 662 bp

M: DNA マーカー (100 bp DNA Ladder, タカラバイオ株式会社)



また、これらの菌株について病原性を調査したところ、いずれも水稻に対する病原性が認められ、選択培地を用いた再分離試験では接種後の検体から *Fusarium* 属菌に特徴的な褐色のコロニー発生が確認された (図 5)。



図 5 現地の各育苗工程を経過した供試苗から単離した菌株の病原性調査 (各単離菌株の接種苗からの病原体の再分離)

現地の各育苗工程を経過した水稻検体から得た単離菌株について、水稻種子への接種試験で病原性を確認した。各菌株の孢子懸濁液 ( $1 \times 10^6$  個  $\text{mL}^{-1}$ ) を減圧接種した水稻種子を 2.5 葉期まで育苗し、苗の葉鞘基部から 5 mm 切片または不発芽種子を採取して検体とした。各検体を表面殺菌後に Fo-G2 培地に置床し、25 °C の人工気象器内で 10 日間培養し、*Fusarium* 属菌に特徴的な褐色コロニーの形成の有無から病原性を確認した。検体数は菌株あたり 5 検体とし、培地上で横一列に配置した。

浸種: 浸種開始～浸種終了時まで供試した検体から単離した菌株

催芽: 催芽開始～催芽終了時まで供試した検体から単離した菌株

出芽～育苗: 出芽開始～本葉 2.5 葉期まで供試した検体から単離した菌株

出芽: 出芽開始～出芽終了時まで供試した検体から単離した菌株

育苗: 育苗開始～本葉 2.5 葉期まで供試した検体から単離した菌株

括弧内の数値は検体からの再分離を確認した菌株数を示す。

以上の同定試験結果をもとに、各育苗工程におけるばか苗病の感染状況を表 2 に示す。

表 2 各育苗工程後に回収した水稻種子または苗におけるばか苗病の感染状況

調査年	調査地点	2.5葉期苗の保菌苗率 (%)				
		浸種 <sup>1)</sup>	催芽 <sup>1)</sup>	出芽～育苗 <sup>2)</sup>	出芽 <sup>2)</sup>	育苗 <sup>2)</sup>
2013	A	0	0	12.0	-	-
	B	20.8	3.1	9.0	-	-
	C	0	0	3.0	-	-
2014	A	0	0	7.0	-	-
	B	0	3.0	9.0	-	-
	C	0	0	8.0	-	-
2015	A	0	0	-	0.7	24.0
	B	0	0	-	2.0	0
	D	0	0	-	0.7	0

現地の各育苗工程を経過した水稻種子または苗におけるばか苗病の病原体の検出状況を示す。2.5 葉期苗の保菌苗率は、現地より回収した検体から、病原性を有するばか苗病の病原体が検出された割合を示す。

<sup>1)</sup>調査苗数: 96 本 (2013 年)、100 本 (2014 年)、150 本 (2015 年)

<sup>2)</sup>調査苗数: 育苗箱 1 枚より苗 100 本を抽出(2013、2014 年)、育苗箱 3 枚より苗 150 本を抽出 (2015 年)

-: 未調査

2013 年および 2014 年の調査において、出芽～育苗工程の保菌苗率は 3.0～12.0 %で、いずれの調査地点でもばか苗病の感染が確認された。また、この期間を出芽と育苗の 2 工程に分割した 2015 年の調査結果では、出芽工程の保菌苗率は 0.7～2.0 %で、いずれの調査地点でもばか苗病の感染が確認された。なお、その他の育苗工程においても、浸種工程で 20.8 % (調査地点 B、2013 年)、催芽工程で 3.0～3.1 % (調査地点 B、2013、2014 年)、育苗工程で 24.0 % (調査地点 A、2015 年)の保菌苗率がそれぞれ確認された。

### 3. 考察

山形県内の種子消毒を温湯浸法で実施している育苗施設を対象に、ばか苗病の感染動態を調査したところ、調査した 3 地点のいずれでも出芽開始から 2.5 葉期までの育苗工程で感染が生じていることが明らかになった。さらにこの工程を出芽開始から出芽終了時およびハウスでの育苗開始から 2.5 葉期までに分割して調査したところ、いずれの調査地点でも前者の出芽工程で感染が生じていることが確認された。これまでも育苗期間中の気象条件によってばか苗病の発生状況が異なることから、浸種および催芽時に感染が生じることが言及されていたが (笹原, 2013)、本調査では浸種、催芽、出芽および育苗のいずれの工程でも感染が生じることを明らかにした。特に全調査地点で感染が共通して確認された出芽工程は防除上、重要な育苗工程と考えられる。これまで、現場におけるばか苗病の感染は浸種から出芽までの期間に限られると考えられていたが (金田ら, 2011)、本調査ではハウスでの育苗開始から 2.5 葉期の間に感染が生じることが確認され、汚染種子に由来するような、典型的な種子伝染と異なる感染経路が存在する可能性が示唆された。

## II 播種前の育苗箱からのばか苗病菌の検出

### 緒言

上述の試験により、調査した育苗施設ではいずれも出芽工程中にばか苗病の感染が確認されたが病原体の由来については不明である。ただし、出芽処理中に水稻種子が直接もしくは間接的に接触する資材は育苗土、育苗箱、育苗器など限定されており、

上述の調査地点ではこれらの資材が汚染していた可能性がある。本節では出芽工程における感染源の特定を目的とし、汚染が疑われる資材のうち育苗箱を対象として *F. fujikuroi* による汚染の有無を調査した。

## 1. 材料と方法

### (1) 調査地点

調査は 2015 年に、上述のばか苗病の感染動態を調査した育苗施設 3 施設（調査地点 A、B、D）でおこなった。

#### 1) 育苗箱からの菌株単離および同定

本調査では播種前に各調査地点の育苗箱から生物検定により菌株の単離操作を実施した。すなわち、育苗箱の表面を滅菌したペーパータオル（キムワイプ S-200、120 mm×215 mm、日本製紙クレシア株式会社）1 枚で拭き取り、これを 50 mL 容の遠沈管に入れ、さらに滅菌した市販育苗培土（平成培土特号；株式会社片倉チッカリン）を約 10 mL 添加して苗床とした。生物検定には前年度産の「はえぬき」健全種子を用いた。温湯浸法（60 °C、10 分間）で種子消毒した供試種子を、滅菌蒸留水で浸種（10 °C、7 日間）および催芽（30 °C、24 時間）し、上述の遠沈管あたり 5 粒を播種し、人工気象器（16 時間日長、30°C : 20 °C）で 2.5 葉期まで育苗した。

なお、本調査は調査地点あたり任意の育苗箱 50 枚を対象とし、衛生的に管理している農研センターの育苗器を対照区とした。単離菌株の同定およびイネに対する病原性の確認については第 1 章と同様の手法で接種試験を実施し、*F. fujikuroi* が検出された育苗箱の割合を算出した。

## 2. 実験結果

各育苗施設において、管理している任意の育苗箱表面を拭き取ったペーパータオルを接種した育苗培地にて水稻種子を育苗したところ、一部検体からばか苗病の特徴的な病徴である徒長症状が認められた（図 6）。



図 6 生物検定による育苗箱からの病原菌の検出

各調査地点から播種前に任意の育苗箱を採取し、滅菌したペーパータオルで育苗箱表面を拭き取って 50 mL 容の遠沈管に充填した。本遠沈管に滅菌した育苗培土を添加および健全種子 5 粒を播種し、人工気象器内で 2.5 葉期まで育苗した。代表として調査地点 A の試験写真を示す。

左： ばか苗病の発病が見られたサンプル (調査地点 A)

右： 健全な苗の生育 (対照区)

育苗箱あたり任意の1菌株を単離し、それぞれの単離菌株を20℃のPDA培地上で7日間培養後、抽出したDNAを鋳型としてTEF1とTEF2のプライマーセットで遺伝子増幅および電気泳動したところ、既知の*F. fujikuroi* 菌株 (Ka52 株、Maff244851)と同じ位置にバンドが確認された (図7)。

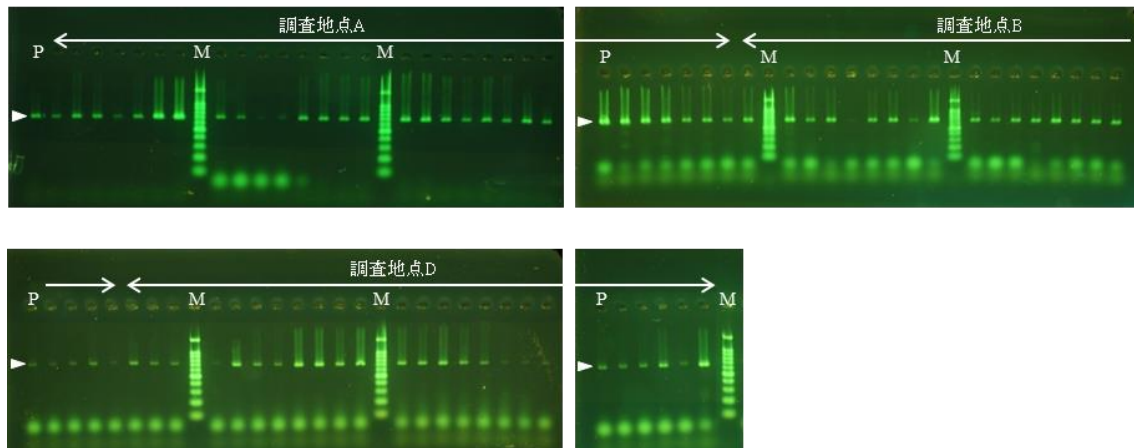


図 7 TEF1 および TEF2 プライマーセットで遺伝子増幅した育苗箱由来の単離菌株の電気泳動写真

播種前の育苗箱表面を拭取ったペーパータオルを育苗培土に接種し、2.5 葉期まで育苗した水稻苗から菌株を単離した。本菌株から抽出した DNA を鋳型として *Fusarium* 属菌の種同定に有用な *TEF1*- $\alpha$  領域を増幅した PCR 産物を電気泳動した。調査地点 A : 30 菌株、調査地点 B : 21 菌株、調査地点 D : 24 菌株

P: *F. fujikuroi* Ka52 株 (MAFF244851) 、矢頭 : 662 bp

M: DNA マーカー (100 bp DNA Ladder, タカラバイオ株式会社)



また、これらの菌株を水稻種子に接種して病原性を調査したところ、いずれもばか苗病の典型症状が認められ、選択培地を用いた再分離では培養した切片から *Fusarium* 属菌に特徴的な褐色のコロニー発生が確認された (図 8)。

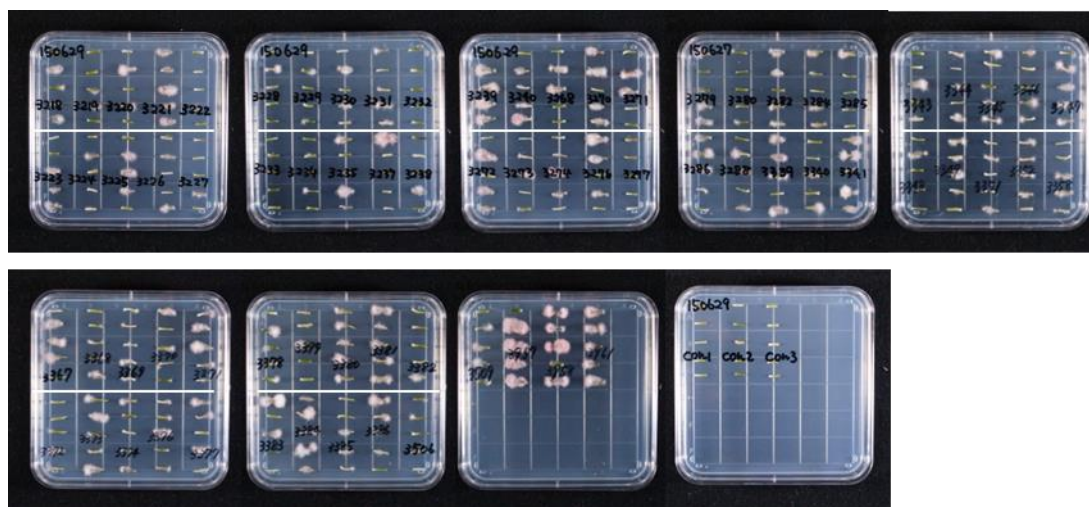


図 8 育苗箱に由来する単離菌株の病原性調査 (選択培地を用いた接種苗からの菌株再分離)

各地点の育苗箱から水稻の生物検定で単離した菌株より孢子懸濁液 ( $10^6$  個  $\text{mL}^{-1}$ ) を調製して、健全な水稻種子に減圧接種 (30 分間) した。菌株あたり 5 粒の水稻の接種種子を作成し、2.5 葉期まで人工気象器内で培養および各葉鞘の地際から 5 mm 程度の切片を作成した。各切片は表面殺菌後、Fo-G2 培地上に縦列に置床して 25 °C で 10 日間培養した。

調査地点 A の単離菌株 (29 菌株) : 3218~3276 (3233 は陰性)

調査地点 B の単離菌株 (21 菌株) : 3277~3358 (3277 は陰性)

調査地点 D の単離菌株 (24 菌株) : 3367~3961

健全苗 (3 検体) : con1, con2, con3

本コロニーが発生した切片数が1個以上の病原性が認められた菌株数は、調査地点 A, B, C それぞれで 28 菌株 (29 菌株中)、20 菌株 (21 菌株中)、24 菌株 (24 菌株中) であった (図 8)。

以上の同定試験結果をもとに、病原性を有する *F. fujikuroi* が検出された育苗箱の割合を表 3 に示す。*F. fujikuroi* が検出された育苗箱の割合は、衛生的な管理をしている対照区の山形県農業総合研究センターで 0 % であったのに対し、調査地点 A、B、D ではそれぞれ 56 %、40 %、48 % で、いずれの現地育苗施設でも播種前の育苗箱が *F. fujikuroi* に汚染していることが明らかとなった。

表 3 *F. fujikuroi* による育苗箱の汚染状況

調査地点	汚染育苗箱割合 (%)
A	56
B	40
D	48
センター	0

汚染育苗箱割合は、播種前の育苗箱表面を拭取ったペーパータオルを育苗培土に接種し、本培土に播種および育苗管理した水稻検体 (5 粒/育苗箱) から、ばか苗病の病原体が検出された育苗箱の割合を示す。本試験は反復なしで、地点あたり任意の育苗箱 50 箱を調査した。

### 3. 考察

第一章でばか苗病の感染動態を調査した育苗施設を対象とし、出芽工程における感染源として疑われる育苗箱について生物検定を試みたところ、いずれの施設からも育苗箱から *F. fujikuroi* が検出され、その割合は 4 割以上であった。本試験では育苗箱表面に存在した病原体の菌密度は不明であるが、これらの汚染された育苗箱が出芽工程におけるばか苗病の感染源である可能性が示唆された。

一般的に、出芽処理時は育苗箱を重ね合わせた状態で実施することから、育苗

箱の摺り切りまで充填された育苗培土および出芽した葉鞘は他の育苗箱と直接接触する。このため、第一章の調査で農研センターから持ち込んだ育苗箱は、病原に汚染した現地の育苗箱と接触した培土および葉鞘を介して、ばか苗病に感染したと推察される。

なお、本調査で育苗箱から検出された病原体は、前年度にばか苗病が発生した苗残渣または汚染培土に由来すると推察される。聞き取り調査によれば、いずれの育苗施設でも前年度に使用した育苗箱は水道水を用いた水洗いで苗残渣および培土を除去したのち、常温下の室内で保管されており、薬剤等を用いた消毒処理は行われていない。一般的に処理枚数が多いため、育苗箱の水洗では、培土および苗残渣を完全に除去することは困難で、現地では洗浄後の育苗箱でも特に根部が残留したものが多くみられる。ばか苗病菌は常温下の土壌中で 16 ヶ月間、また乾燥した刈り株残渣中では 26～28 ヶ月間の生存が報告されていることから (Sunder and Satyavir., 1998)、上述の残渣が翌年の感染源となる可能性が考えられる。

### III 出芽後の育苗器からのばか苗病菌の検出

#### 緒言

上述の調査により、汚染した育苗箱が出芽工程中のばか苗病の感染源である可能性が示唆されたが、もうひとつの候補として育苗器が挙げられる。出芽工程に用いられる一般的な育苗器は密閉した空間で蒸気を利用した加温処理をおこなうため、育苗器内部が病原に汚染していた場合、蒸気を介した感染が生じる可能性も考えられる。本節では、現地で慣行使用されている育苗器を対象に、*F. fujikuroi* による汚染の有無を調査した。

#### 1. 材料と方法

##### (1) 調査地点

調査は 2015 年に、上述のばか苗病の感染動態を調査とした育苗施設 3 施設 (調査地点 A、B、D)でおこなった。

##### (2) 育苗器からの菌株単離および同定

各育苗施設で慣行使用している育苗器の汚染状況を明らかにするため、出芽処理の終了時に育苗器の内側表面に付着している水滴を対象とし、*F. fujikuroi* の有無について生物検定を実施した。すなわち、出芽終了時に、育苗器内側の任意の側面約 4 m<sup>2</sup> を滅菌したペーパータオル (キムタオル、34×38 cm、日本製紙クレシア株式会社) で拭き取って水滴を採取し、本ペーパータオルを 16 分割後、各分割片を 50 mL 容の遠沈管に入れた。続いて本遠沈管に滅菌した市販育苗培土を約 10 mL 添加して苗床とし、第 2 章 II の手法と同様に生物検定を実施した。具体的には、本遠沈管に温湯浸法 (60 °C、10 分間) で種子消毒し、滅菌蒸留水で浸種 (10 °C、7 日間) および催芽 (30 °C、24 時間) した前年度産の「はえぬき」健全種子 5 粒を播種し、人工気象器 (16 時間日長 30 °C : 20 °C) で 2.5 葉期まで育苗した。育苗後は調査地点あたり 80 本すべての苗を対象に、第 2 章 I と同様の手法で *F. fujikuroi* の保菌苗率を算出した。なお、農研センターで衛生的に管理している育苗器を対照区とした。

## 2. 実験結果

各調査地点から採取した、出芽処理直後の育苗器に由来する単離菌株から抽出した鋳型 DNA を TEF1 および TEF2 のプライマーセットで遺伝子増幅および電気泳動したところ、既知の *F. fujikuroi* 菌株 (Ka52 株、Maff244851) と同じ位置にバンドが確認された (図 9)。

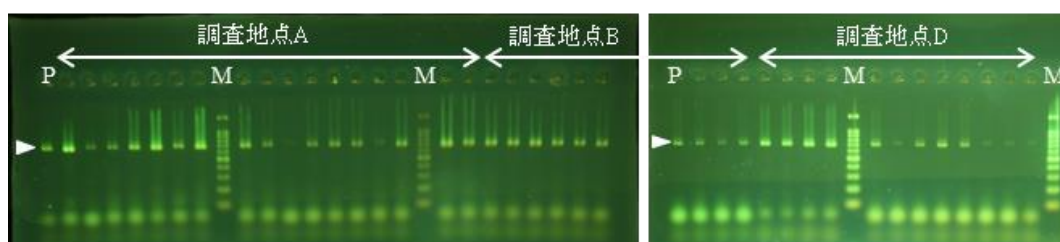


図 9 TEF1 および TEF2 プライマーセットで遺伝子増幅した育苗器由来の単離菌株の電気泳動写真

出芽処理直後の育苗器の内部表面を拭取ったペーパータオルを育苗培土に接種し、2.5 葉期まで育苗した水稻苗から菌株を単離した。本菌株から抽出した DNA を鋳型として *Fusarium* 属菌の種同定に有用な *TEF1-α* 領域を増幅した PCR 産物を電気泳動した。

調査地点 A： 17 菌株、調査地点 B： 10 菌株、調査地点 D： 11 菌株

P: *F. fujikuroi* Ka52 株 (MAFF244851)、矢頭： 662 bp

M: DNA マーカー (100 bp DNA Ladder, タカラバイオ株式会社)

また、これらの菌株を水稻種子に接種して病原性を調査したところ、いずれもばか苗病の典型症状が認められ、選択培地を用いた再分離では培養した切片から *Fusarium* 属菌に特徴的な褐色のコロニー発生が確認された。1 個以上の切片から本コロニーの発生を確認した菌株数は、調査地点 A, B, D それぞれで 17 菌株 (17 菌株中)、10 菌株 (10 菌株中)、11 菌株 (11 菌株中) で、調査した単離菌株のいずれでも病原性が認められた。

以上の同定試験結果をもとに、*F. fujikuroi* による育苗器の汚染状況に関する調査結果を表 4 に示す。調査地点あたり 80 本の苗を調査したところ、2.5 葉期苗の保菌苗率は農研センターで 0 %であったのに対し、調査地点 A, B, D ではそれぞれ 21.3 %、12.5 %、13.8 %であった (表 4)。よって、いずれの調査地点でも出芽処理後の育苗器の内側表面に *F. fujikuroi* が存在することが明らかとなった。

表 4 出芽直後の育苗器における *F. fujikuroi* の汚染状況

調査地点	汚染の有無
A	+ (21.3)
B	+ (12.5)
D	+ (13.8)
センター	－ (0)

＋：病原体の汚染を確認

－：病原体の汚染は未確認

表中の括弧内は、出芽直後に育苗器内部の任意の側面 (約 4 m<sup>2</sup>) を拭取ったペーパータオルを育苗培土に接種し、本培土に水稻種子を播種および 2.5 葉期まで育苗後、ばか苗病の病原体が検出された水稻検体 (80 粒/地点) の割合を示す。本試験は反復なしで、地点あたり育苗器 1 個を調査した。

### 3. 考察

出芽工程におけるばか苗病の感染源の候補として、第 2 章 I で感染を確認した調査地点を対象に育苗器の汚染について調査したところ、いずれの調査地点でも出

芽処理後の育苗器の内側表面に *F. fujikuroi* が存在することを明らかにした。これらの菌の由来は、出芽処理前から育苗器に存在したのか、もしくは汚染育苗箱などの他の要因によるものかは本調査からは不明であるが、出芽処理中の育苗箱は病原が存在する育苗器内で高湿度・高温という感染に好適な条件に曝露されていたことは、感染の一因となったと推察される。聞き取り調査によると、いずれの育苗施設でも使用後の育苗器を防除目的で洗浄または消毒するという概念はなく、出芽処理時に付着した培土残渣を水洗および自然乾燥した育苗器は、翌年まで施設内で常温保管されている。上述のとおり、病原の生存期間は1年以上にわたることから、育苗器表面に残留した病原が翌年の感染源となる可能性が懸念される。また、育苗時のばか苗病の防除においては、空気伝染も考慮した施設衛生管理の重要性が報告されており（鈴木ら, 2017）、前年度に発生が認められた施設では、感染源となりうる育苗器の衛生管理も本病の防除に有効と考えられた。

### 第3章 プラズマ照射によるばか苗病汚染種子の殺菌

#### I プラズマ照射による発病抑制効果

##### 緒言

現在、水稻の生産現場では一般的なばか苗病の防除として化学合成農薬を用いた種子消毒が実施されている。一方で有機栽培等の環境保全型農業を採用している生産現場では、化学合成農薬の代替技術として早坂ら (1999)が開発した、60 °C程度の温湯に種子を浸漬する温湯浸法が普及している。

本法は開発当初、ばか苗病に対して 60 °Cで 15 分間の処理条件で化学合成農薬と同等の防除効果が得られると報告されたが (早坂ら, 2001)、水稻種子の熱耐性には品種間差があり、処理条件によっては化学合成農薬と比較して防除効果が劣る事例が報告されている (林ら, 2002)。また、温湯浸法により無消毒種子と比較してばか苗病の感染リスクが高まることが報告されており (鈴木, 2017)、これらの課題に対して生産現場では温湯浸法の代替技術または体系処理用の補完防除技術が求められている。従来の温湯浸法は熱を用いた殺菌手法であり、一定以上の熱処理は種子発芽率を低減させることから (早坂ら, 1999)、本体系処理には熱と異なる殺菌源が必要となる。

プラズマは固体、液体、気体に続く物質の第 4 の状態で、大気圧プラズマは大気圧下で生じさせたプラズマの一種である。本プラズマは水と反応することで殺菌効果を有する複数の活性酸素種 (ROS)を生成することが知られている (Hayashi *et al.*, 2014)。また、トマト等の一部農作物における糸状菌性病原体の生育抑制効果が報告されている (Lu *et al.*, 2014)。ここでは本プラズマを殺菌源とする温湯浸法の補完防除技術の開発を目的として、プラズマ照射の実用性について検討した。

#### 1.材料と方法

##### (1) 大気圧プラズマ照射装置

本研究におけるプラズマ照射には東北大学工学研究科金子研究室で作製された装置を用いた (図 10)。



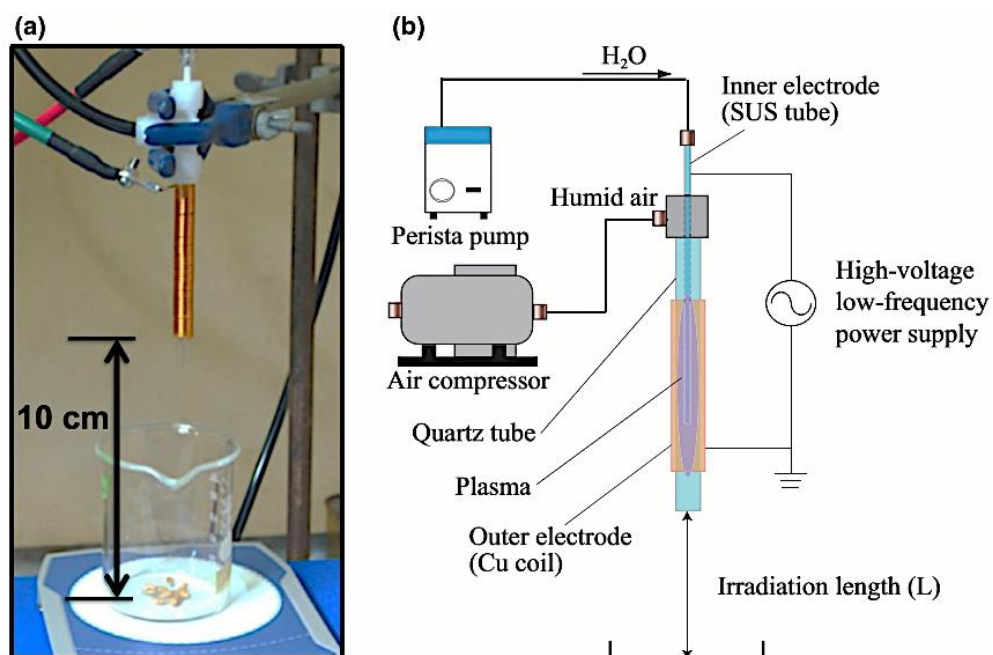


図 10 大気プラズマ照射装置の概要

- (a) 装置の放電電極部: ビーカー内の種子は互いに重ならないようプラズマ照射した。
- (b) 装置の構成概要: 電極が取り付けられている石英管の底部から水稻種子までの距離は 10 cm に設定した。

本装置は内径 4 mm・外径 6 mm の石英チューブ、内径 0.9 mm・外径 1.26 mm のステンレススチール製の内部電極および長さ 55 mm の銅コイル製の外部電極から成り、プラズマ放電量は外部電極の長さに依存する。プラズマ照射による活性酸素の生成を効率的にするため、照射中に空気と蒸留水をプラズマ中に供給する構成となっており、それぞれの供給量は、 $16 \text{ L min}^{-1}$ 、 $91 \mu\text{L min}^{-1}$  である。低周波高電圧 (c. 20 kV、c. 10 kHz) を内部電極に供給し、外部電極を接地させた。本装置を用いた水稻種子へのプラズマ等の供給を、以降プラズマ照射とする。

## (2) 供試種子および病原菌株

本試験には、ばか苗病を甚発生させた圃場から採種した、自然感染種子を供試した。本圃場は病原を人工接種した汚染種子を育苗および移植することで、人為的に甚発生を促した。すなわち、*F. fujikuroi* Ka52 株 (MAFF244851) を PDA 培地 (BD Difco) で 25 °C、暗条件下で 7 日間培養して適量の滅菌蒸留水を加えたのち、毛筆で培地表面の菌糸をかきとり、不織布 (Merck Millipore) でろ過し、菌密度を  $10^5$  個/mL に調整した孢子懸濁液を接種源とした。この孢子懸濁液に前年度産の健全な「はえぬき」種子を浸漬して 30 分間の減圧接種処理をおこない、滅菌蒸留水で 3 回リンスして人工接種種子とした (Jones *et al.*, 1981)。こうして作製した人工接種種子 (120 g) を滅菌蒸留水で浸種 (10 °C、7 日間)、催芽 (30 °C、24 時間) 後に、滅菌した育苗培土 (平成培土特号；株式会社片倉チッカリン) を充填した慣行の育苗箱 (30×60×3 cm) に播種および出芽処理 (30 °C、3 日間) を行った。出芽後の育苗箱は概ね 20 °C に管理した育苗ハウスで 1 か月間育苗し、慣行に従って水田へ機械移植および圃場管理をおこなった。収穫した種子は、*Fusarium* 属菌の選択培地である Fo-G2 培地を用い (Nishimura, 2007)、100 % の種子が *Fusarium* 属菌を保菌していることを確認した。なお、対照区には別の衛生的に管理した圃場から収穫した健全種子を用いた。

## (2) プラズマ照射によるばか苗病の抑制効果

プラズマ照射の前処理として、慣行の温湯浸法でばか苗病が完全に防除できなかった状態を再現するため、供試種子を慣行より低温の 50 °C で 10 分間の条件で、

病原が残留するように浸漬処理した (林ら、2002)。浸漬後、供試種子は滅菌蒸留水で3回リンスした後、滅菌したペーパータオルで余分な水分を除去し、湿った状態でプラズマ照射をおこなった。プラズマ照射は、装置の石英管底部から10 cmの距離で、ガラスビーカーに入れた任意の供試種子10粒に対しておこない、照射時間は10分間で、2分おきにビーカーを攪拌した (図10)。また、対照として同様に湿らせた種子に空気のみを処理した区を設けた。

プラズマ照射後は速やかに種子を50 mLの滅菌蒸留水中で催芽処理 (28 °C、2日間、暗条件)し、滅菌した市販育苗培土 (クミアイ培土「L」)に播種して25°Cの人工気象器内 (光強度  $171.43 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、LPH-240SP; Nippon Medical & Chemical Instruments Co.)で14日間育苗した。試験は3反復実施し、*F. fujikuroi* によるばか苗病の発生調査として、発病苗率および発病度を調査した。処理条件あたりの調査種子数は10粒とし、培養時の人工気象器内における検体の配置は無作為におこなった。苗の発病調査は発病率の平均について、対照区とプラズマ照射とを統計的に比較した (Student's-t test)。発病の程度は Zainudin *et al.* (2008)を参考に5段階の指標を用いて評価した (0: 未感染の健全苗、1: 苗丈は正常だが、葉鞘に黄化が認められる、2: 葉鞘の幅縮小および黄化を伴う、苗丈の徒長または縮小が認められる、3: 葉鞘の黄化または幅縮小と褐変を伴う、苗丈の徒長または縮小が認められる、4: 苗の枯死、または苗表面に菌糸が認められる)。また発病度は上述の指数を用いて、以下の数式から算出した。

$$\text{発病度} = [(1A + 2B + 3C + 4D)/4N] \times 100$$

A=発病指数1の個体数、B=発病指数2の個体数、C=発病指数3の個体数、

D=発病指数4の個体数、N=総調査苗数

発病度の調査苗数は処理条件につき10本とし、プラズマ照射と対照との比較は2標本t検定の代替であるウィルコクソンの順位和検定 ( $P < 0.01$ )でおこなった。プラズマ照射による発病度の低減調査は3反復実施した。

#### (4) プラズマ照射の種子発芽および生育への影響

プラズマ照射が水稻種子の生存に与える直接的な影響を調査するため、健全種子を50 °Cの蒸留水で10分間浸漬後、上述の手法でプラズマ処理を10分間または

15 分間おこなった。プラズマ照射後の種子はただちに 50 mL の蒸留水中で浸種処理 (28 °C、2 日間、暗条件)した。プラズマ照射した種子の発芽状況 (発芽率と発芽の均一性)およびその後の人工気象器内での 14 日間の苗生育 (異常生育の苗数)は毎日観察をおこなった。本調査では処理条件あたりの種子数を 50 粒とし、試験は 3 反復実施した。プラズマ照射および浸種した種子の発芽率については、プラズマ照射時間が 0、10 および 15 分間の処理区間ごとに統計的に比較した (Tukey's post hoc test ( $P < 0.05$ ))。

(5) 苗からの菌株コロニー形成操作によるプラズマ照射の効果検証

プラズマ照射の防除効果を確認するため、プラズマ照射後の *F. fujikuroi* の汚染種子を育苗した苗から、菌株コロニー形成の有無を調べた。本操作では汚染種子 40 粒を 25 °C で 10 分間蒸留水に浸種後、滅菌ペーパータオルで完全に蒸留水を除去し、湿った状態の種子を 10 粒ずつプラズマ照射した。プラズマ照射時間は 0、1、5、および 10 分間とした。対照として 40 粒の健全種子を蒸留水に 25 °C で 10 分間浸漬およびプラズマ照射 (0、1、5、および 10 分間)した。併せて、10 粒の乾燥した *F. fujikuroi* の汚染種子および 10 粒の乾燥した健全種子それぞれを、直接プラズマ照射 (0、1、5、および 10 分間)した。所定時間のプラズマ照射をした種子はすみやかに 50 mL の蒸留水で催芽処理 (28°C、2 日間、暗条件)をおこなった。出芽した種子は上述と同じ手法で培養した。試験は 3 反復で実施した。

育苗した苗からの菌株コロニー形成操作には、各プラズマ照射または対照の苗 10 本から採取した葉鞘片 10 個を用いた。葉鞘片の長さは 10 mm とし、各苗の地際基部から切除した。葉鞘片は 70 %エタノールで 10 秒間の表面殺菌および蒸留水で 3 回リンスした後、*F. fujikuroi* に選択性のある駒田培地 (Komada, 1975)または Fo-G2 培地に置床し、25 °C で 7 日間培養した。菌糸が発生した葉鞘片数の計測および撮影後、葉鞘片 10 個あたりの菌株コロニーを形成した葉鞘片数の割合を算出した。本割合については、プラズマ照射をそれぞれ 0、1、5 および 10 分間おこなった蒸留水処理と未処理種子との間で統計解析した (Tukey's post hoc test ( $P < 0.05$ ))。本試験は 3 反復おこなった。なお、それぞれの菌株コロニーは種同定のため、PDA 培地に移植後に 25 °C で培養した。

#### (6) *TEF1- $\alpha$* 領域に基づいた種の同定

PDA 培地で培養した菌株の種同定における相同性検索は、*TEF1- $\alpha$* 領域遺伝子を対象とし、第二章と同様におこなった。

#### (7) 水稻種子における $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生の DAB 染色による組織化学的な検出

プラズマ照射した健全種子における  $\text{H}_2\text{O}_2$  の産生を検出するため、25 °C の蒸留水で 10 分間浸漬して 10 分間のプラズマ照射をおこなった健全種子 6 粒と、未浸種で 10 分間のプラズマ照射をおこなった健全種子 6 粒とを設けた。また対照として、蒸留水で浸種または未浸種の種子に空気のみを処理したそれぞれの種子 6 粒を設けた。25 °C の蒸留水で 10 分間の浸漬につづいてプラズマ照射または対照の空気を 10 分間処理後、それぞれの水稻種子をただちに剃刀で垂直方向に薄切りにし、1 mg mL<sup>-1</sup> の 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 2 mL に浸漬および 25 °C の暗条件で 12 時間培養した。本反応は 10 mM のアスコルビン酸塩を 100  $\mu$ L 加えて停止させ、これら種子の切片を撮影した。

## 2. 実験結果

### (1) プラズマ照射による種子発芽および苗生育への影響

50°C の蒸留水で 10 分間浸漬後にプラズマを照射した健全種子の播種 7 日後の発芽率は、プラズマの 10 分間照射では約 38 %、15 分間照射では約 37 %で、いずれもプラズマ未処理の種子と有意差は認められなかった。また、播種 14 日後の発芽率は、プラズマの 10 分間照射では約 95 %、15 分間照射で約 99 %で、いずれもプラズマ照射の未処理種子と有意差はなく(図 11A, B)。、外観上の異常苗も認められなかった (図 11C)。これらの結果は、3 回の独立した試験で再現可能であった。

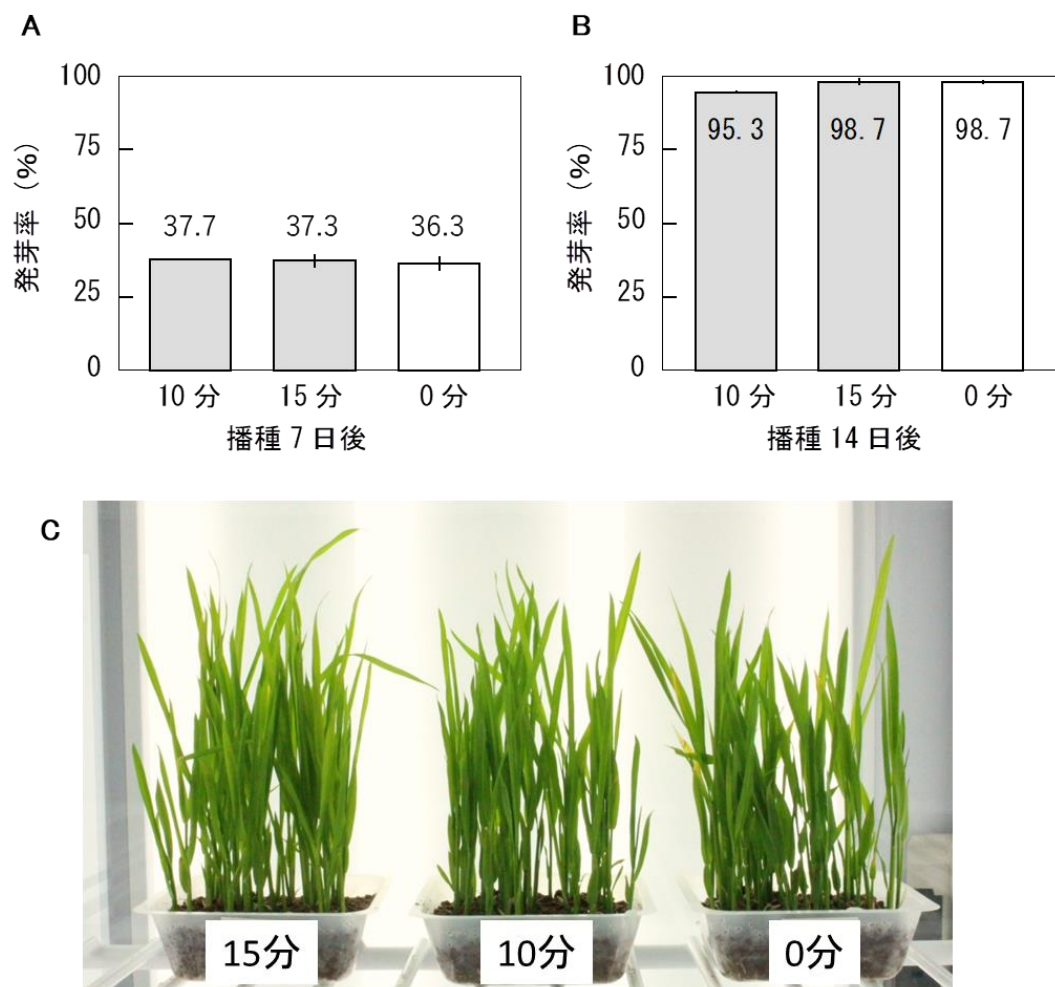


図 11 プラズマ照射した水稻種子の発芽率および育苗状況

温湯浸法 (50 °C、10 分間)後にプラズマ照射 (0 分間, 10 分間, 15 分間)した健全種子を蒸留水で催芽 (28 °C、2 日間、暗条件)し、ろ紙を敷いて蒸留水を加え、湿室条件にしたシャーレに播種した。発芽率は 20 °Cの人工気象器内で播種 7 日後 (A)および 14 日後 (B)に正常発芽した種子数からそれぞれ算出した。供試種子数は処理条件あたり 50 粒とし、試験は 3 反復実施した。図中の数値は 3 反復平均値、エラーバーは標準誤差、0 分・10 分・15 分はプラズマ照射時間をそれぞれ示す。播種 7 日後および 14 日後の発芽率は、いずれの処理区間でも有意差は認められなかった (Tukey's post hoc test,  $P < 0.05$ )。

C: プラズマ照射および催芽を同様におこなった種子を、滅菌した育苗培土を充填したポリスチレン容器 (80×80×25 mm)に播種し、20 °C、16 時間明期の人工気象器内で 14 日間育苗した苗。供試種子数は処理条件あたり 50 粒で試験は 3 反復実施し、図には代

表の 1 試験を示す。図中の 0 分・10 分・15 分はプラズマ照射時間を示す。

## (2) プラズマ照射によるばか苗病の発病抑制

温湯浸法の不十分な防除効果を再現した 50℃の蒸留水で 10 分間浸種した *F. fujikuroi* の汚染種子を 2.5 葉期まで育苗したところ、発芽直後の枯死を含む、ばか苗病の典型的な徒長症状がみられた (図 12a)。またプラズマ照射を 10 分間おこなった場合、2.5 葉期苗の発病率はプラズマ照射の未処理苗と比較して明らかな低減が認められた (図 12b)。同様に、発病程度はプラズマの 10 分間照射では 2.5, 10.0, 20.0 であったのに対し、未処理ではそれぞれ 28.3, 67.5, 65.0 で、いずれも有意な発病程度の低減が認められた (図 12c-e)。

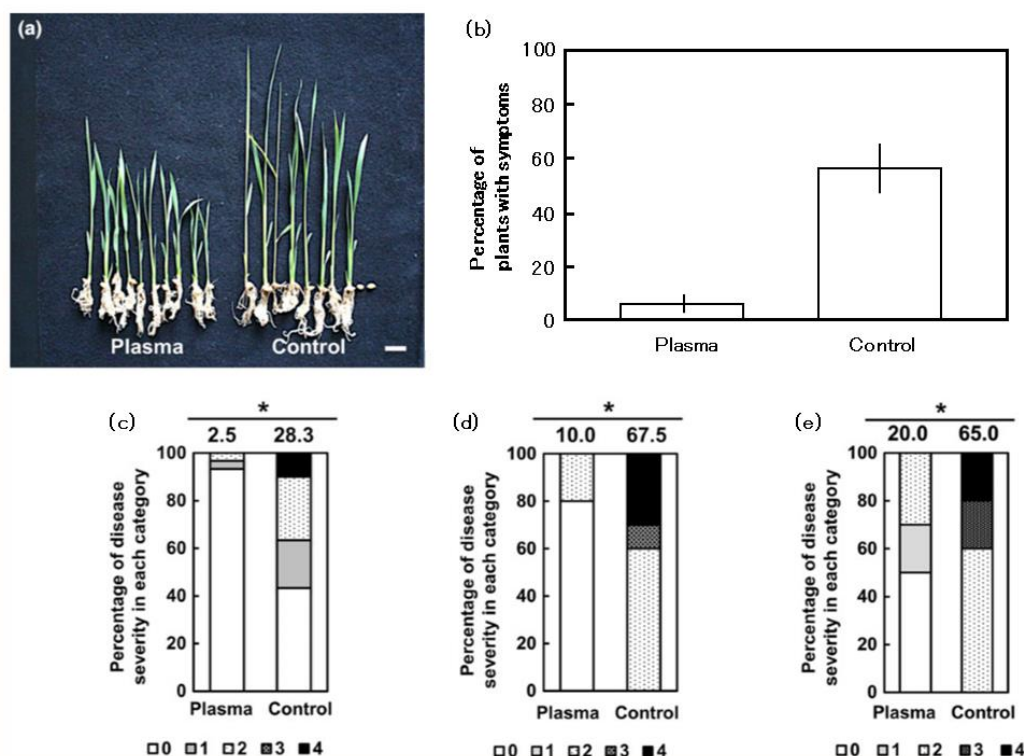


図 12 *Fusarium fujikuroi* の汚染種子への大気プラズマ照射がばか苗病の発病に与える影響

50 °Cの蒸留水で10分間浸漬した *Fusarium fujikuroi* の汚染種子にプラズマ照射をおこなった。プラズマ照射 (Plasma)または空気のみを処理 (Control)した供試種子を蒸留水で催芽 (28 °C、2日間、暗条件)し、25 °C・14時間の明条件の人工気象器内で14日間培養した水稻苗 (a)。プラズマ照射 (Plasma)または空気のみを処理 (Control)した *F. fujikuroi* 汚染種子を育苗した苗におけるばか苗病の発病苗率 (b)を示す (供試種子10粒、3反復の平均値、エラーバーは標準偏差で、試験区間には有意差が認められた (Tukey法、 $P<0.01$ )。各発病指数に分類される苗の割合および発病程度を示す (c-e)。病徴の程度は0 (未感染苗)、1、2、3および4 (重度の感染苗)で分類し、それぞれを図中の白色、灰色、ドットパターン、濃い斜線パターンおよび黒色の棒線で示す。発病度はそれぞれの棒線上に示す。処理あたりの供試種子数は10粒とし、試験は3反復実施した。アステリスク(\*)はプラズマ照射 (n=10)と対照 (n=10)との間にウィルコクソンの順位和検定 ( $P<0.01$ )で有意差があることを示す。



図 13 に 25 °C の蒸留水に 10 分間浸漬した *F. fujikuroi* の汚染種子に由来する葉鞘切片の、選択培地における菌株コロニー形成を示す。25 °C の蒸留水で 10 分間浸漬後にプラズマ照射の未処理切片からはいずれも菌株コロニーが形成されたが (図 13a 「Infected」 0 min)、健全種子を同条件で処理した対照では菌株コロニーは形成されなかった (図 13a 「Control」 0 min)。25°C の蒸留水に 10 分間浸漬した汚染種子をプラズマ照射した場合、その照射時間が長いほど葉鞘切片からの菌株コロニー形成には明らかな低減が認められた (図 13a 「Infected」 1, 5, 10 min)。一方で、蒸留水に未浸漬の場合、健全種子由来の葉鞘切片からは菌株コロニーは形成しなかったが、*F. fujikuroi* 汚染種子に由来する葉鞘切片からは菌株コロニーの形成が認められた (図 13b 「Infected」 0, 1, 5, 10 min)。さらに、菌株コロニーを形成した葉鞘切片数の平均割合 (3 反復試験) は、25°C の蒸留水に 10 分間浸漬した場合、プラズマ照射の 5 分および 10 分間処理で有意な低減が認められたが、未浸漬では低減しなかった (図 13c)。

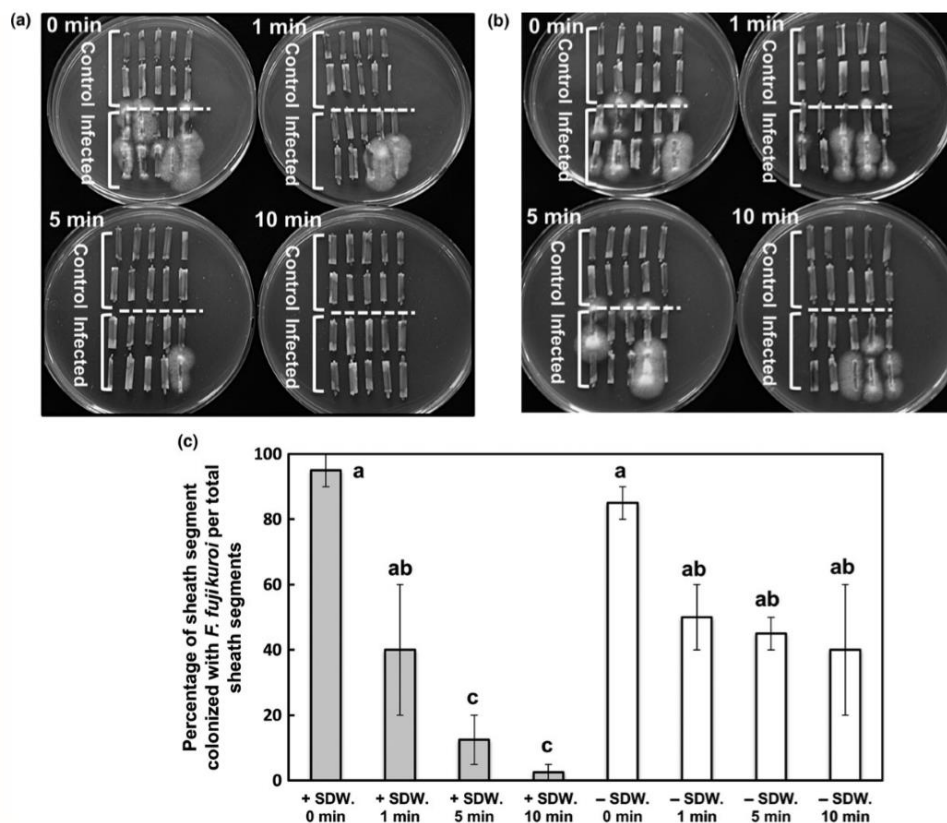


図 13 *Fusarium fujikuroi* の汚染種子を育苗して得た葉鞘切片からの菌株コロニーの形成

葉鞘切片は、プラズマ照射前に 25 °C の蒸留水に浸漬処理 (a) または未処理 (b) の *F. fujikuroi* の汚染種子 (Infected) または健全種子 (Control) を育苗した苗から採取した。プラズマ照射の処理時間は 0, 1, 5, 10 分間とした。汚染種子または健全種子を育苗して採取した各葉鞘切片は、それぞれのシャーレの点線下側に配置した。調査は 3 反復とし、代表的な調査結果を図中に示す (a, b)。 *F. fujikuroi* の汚染種子を育苗して得た葉鞘切片のうち、菌株コロニーを形成した切片数の平均と標準偏差 (エラーバー) を算出した (c)。プラズマ照射 (0, 1, 5, 10 分間) 前に蒸留水の浸漬処理または未処理の種子を育苗した検体のデータは、それぞれ “+SDW” (灰色バー)、“-SDW” (白色バー) で示す。菌株コロニーを形成した葉鞘切片数の平均値は、プラズマ照射 (0, 1, 5, 10 分間) 前に蒸留水の浸漬処理をした種子と未処理種子との間で統計的に比較した (Tukey’s post hoc test ( $P < 0.05$ )). 同一文字は有意差がないことを示す。

これらの結果は、プラズマ照射には *F. fujikuroi* の汚染種子に由来する葉鞘切片における、菌株コロニー形成の抑制効果があることを示すとともに、プラズマ照射の前には 25 °C の蒸留水に 10 分間の浸漬処理が必要なことを明らかにした。

プラズマ照射をおこなわなかった *F. fujikuroi* の汚染種子に由来する各葉鞘切片から、コロニーを単離して増幅した *TEF1- $\alpha$*  領域の塩基配列は、いずれも *F. fujikuroi* の *TEF1- $\alpha$*  遺伝子と 99-100 % の相同性を示した。したがって、葉鞘で形成された菌株コロニーは感染した *F. fujikuroi* に由来することが確認された。

### (3) プラズマ照射した水稻種子における $H_2O_2$ の産生

蒸留水の浸漬およびプラズマ照射をおこなったすべての種子の胚組織で、 $H_2O_2$  による DAB の酸化を示す暗褐色の染色反応が認められた。一方で対照として 25°C の蒸留水の浸漬後にプラズマ照射の未処理種子、または未浸漬でプラズマ照射した種子では、本染色反応は認められなかった (図 14)。

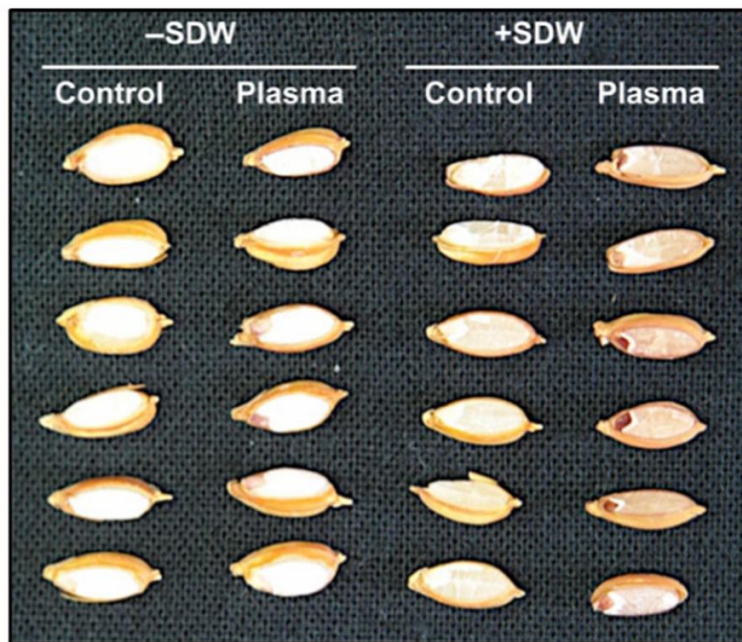


図 14 産生した過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )の組織化学的な検出

25℃の蒸留水に 10 分間の浸漬処理 (+SDW)または未処理 (-SDW)の健全種子に、10 分間のプラズマ照射 (Plasma)または空気のみ処理(Control)した。各照射処理後、垂直方向に薄切りにしたそれぞれの種子を、 $1 \text{ mg mL}^{-1}$  の 3,3'-diaminobenzidine (DAB)に 12 時間浸漬した。暗褐色の染色部は  $\text{H}_2\text{O}_2$  の産生を示す。

したがって、プラズマ照射による  $\text{H}_2\text{O}_2$  の産生は、蒸留水に浸漬した種子で生じることが示唆された。

### 3. 考察

25 °C または 50 °C の蒸留水に 10 分間浸漬した水稻種子に対する最長 10 分間の大気プラズマは、種子発芽およびその苗生育に影響せず、育苗期間におけるばか苗病を有意に抑制した (図 11, 12)。これは汚染種子に対するプラズマ照射が植物体の細胞を損傷することなく、選択的に病原体の生育または感染を抑制することを示唆している。プラズマ照射がばか苗病を抑制する機構は不明である。しかしながら、蒸留水で浸漬していない *F. fujikuroi* の汚染種子を育苗して得た葉鞘切片では菌株コロニー形成の抑制が認められないのに対し (図 13b, c)、25 °C の蒸留水に 5 分または 10 分間浸漬した場合の抑制は顕著であった (図 13a, c)。さらに、25 °C の蒸留水に 10 分間浸漬しても、プラズマ照射をしなかった場合は菌株コロニーの形成が認められた (図 13a, c)。したがって、種子の浸漬処理は、病原の効果的な殺菌または育苗時における病原の生長抑制に不可欠と考えられる。以上より、水稻種子の浸漬およびプラズマ照射の処理体系は、化学合成農薬の使用をおさえ、健康および環境へのリスクを低減可能な防除技術として期待できる。

プラズマを利用した植物病害の防除についてはすでに報告されており、*Philodendron erubescens* 「Green Emerald」では、プラズマ照射によって自然感染葉における黒斑数の減少という病害抑制効果が確認されている (Zhang *et al.*, 2014)。しかしながら、プラズマ照射による *P. erubescens* の自然感染葉組織における菌生育の抑制については調査されていない。自然感染葉から単離した本病原胞子は、PDA 培地上でのプラズマ照射によって奇形となる一方で、照射処理された胞子の発芽能の抑制についても調査はおこなわれていない (Zhang *et al.*, 2014)。また、Lu *et al.* (2014) は、PDA 培地上での *C. fulvum* の生育抑制効果を報告しており、*C. fulvum* の感染したトマト種子と未感染種子との比較により、本種子の腐敗割合がプラズマ処理に依存することを明らかにしている。これらの報告は、本研究で明らかにしたプラズマ照射による種子伝染性病害の防除効果の結果と一致している。今後、プラズマ照射の多様な植物病害の防除への適応性や、感染組織における病原体の生育抑制については、複数の植物種

と病原体との組み合わせを用いたさらなる調査が必要と考えられる。また、本研究のプラズマ照射の体系処理を、他の種子伝染性病害の防除法として実用するためには、種子のサイズや病原体の濃度および種子内の存在部位など、植物と病原体の組合せに応じたプラズマ処理の条件検討が必要と考えられる。なお、プラズマ照射の実用化には、防除コストの検証および大量の種子処理技術の開発など、複数の課題が残っている。

スーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) および一重項酸素を含む活性酸素種 (ROS) は、プラズマによって生成されることが報告されている (Hayashi *et al.*, 2014)。ROS は一般に、細胞膜を酸化して細胞死を誘導する。種子組織における  $\text{H}_2\text{O}$  の存在は、プラズマ照射による  $\text{H}_2\text{O}$  のイオン化によって ROS の生成に関与する可能性がある。事実、蒸留水で浸漬後にプラズマ照射した水稻種子では顕微観察上、胚組織を損傷することなく、種子内における  $\text{H}_2\text{O}_2$  の明らかな蓄積が認められ (図 14)、種子発芽率も正常であった。一方で、プラズマ照射前に蒸留水の浸漬処理をおこなわなかった種子またはプラズマ照射の未処理種子では、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の蓄積は確認されなかった (図 14)。これらの結果はプラズマ照射の ROS 産生作用に由来する  $\text{H}_2\text{O}_2$  が病原体を防除した可能性を示唆している。

プラズマ照射による ROS の産生が防除に機能していることが推察されるが、実際の病原の抑制作用には依然不明点がある。しかしながら、水稻種子の細胞に致命的な損傷を与えることなく、産生した ROS による種子消毒ができることから、プラズマ照射はばか苗病の抑制に有効と考えられる。また、生細胞に対する ROS の悪影響を除けば、一時的な ROS の増加は植物の免疫システムを活性化する防除シグナルを強化することが報告されている (Torres *et al.*, 2006)。したがって、プラズマ照射によって種子中に一時的に生成した ROS は植物の免疫系を誘発し、この照射処理した種子から生育した苗は広範な病原に対して抵抗性を示す可能性がある。よって、プラズマ照射した種子由来の苗における防御遺伝子の発現パターンを解析することにより、プラズマ照射が誘発する病原体に対する植物免疫応答に関連した重要な洞察が得られる可能性がある。プラズマ照射の体系は利点だけでなく、植物病害の防除上の限界があり、病気抑制効果の作用機作について解明が必要である。しかしながら、プラズ

マ照射は温湯浸法を補完する新たな水稻種子伝染性病害の防除技術として今後が期待される。

## 第4章 温湯浸法の代替技術および育苗工程の衛生管理技術の開発

### I 過熱水蒸気を利用した温湯浸法の代替技術

#### 緒言

上述のとおり、温湯浸法は農薬を用いない水稻の種子消毒法として早坂ら (1999) によって開発されたのち、大型の恒温水槽を備えた専用装置の市販化を経て (黒田ら, 2005)、約 10 年で約 3 割の国内シェアとなるまで普及拡大し(岡部ら, 2009)、有機栽培などの生産現場における基幹技術となった。一方で本法は処理時に種子浸漬用水槽の温度維持、1 回当たり 10 分程度の熱処理および種子運搬作業など、燃料費、時間的および人的コストが播種前の短期間に集中することが課題となっている。特に大量の種子を処理する施設では播種の数か月前から作業を開始することから、当該施設では処理後の種子は長期間の貯蔵が必要で、貯蔵前に種子の発芽率低下を回避するための乾燥処理を要することから (洞口ら, 2008)、コスト増加の要因となっている。これらの課題解決のため、温湯浸法の代替技術として殺菌源に高温の過熱水蒸気を用いた水稻種子消毒装置の実用性を検討した。

この過熱水蒸気を用いた消毒技術について、生研センターでは 2010 年から専用装置の開発に取り組んでおり、これまでに 4 回の試作機が開発されている。著者はこれら試作機について、ばか苗病の防除効果および種子発芽への影響等を評価し、適切な処理条件の検討により実用機開発に向けた共同研究を実施してきた。ここでは、これらの試作機の改良を経て、実用機として製作されたフィード方式 4 号機について (野田ら, 2015a、野田ら, 2015b)、ばか苗病に対する防除効果、種子発芽および苗生育に与える影響を確認し、本装置の実用性を検討した。

#### 1. 材料と方法

##### (1)装置概要

水稻種子の過熱水蒸気処理には、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センターで作製されたフィード方式 4 号機を用いた (野田ら, 2015b)。本装置は蒸気生成部、熱処理部、冷却・乾燥部の 3 機構から成る (図 15)。



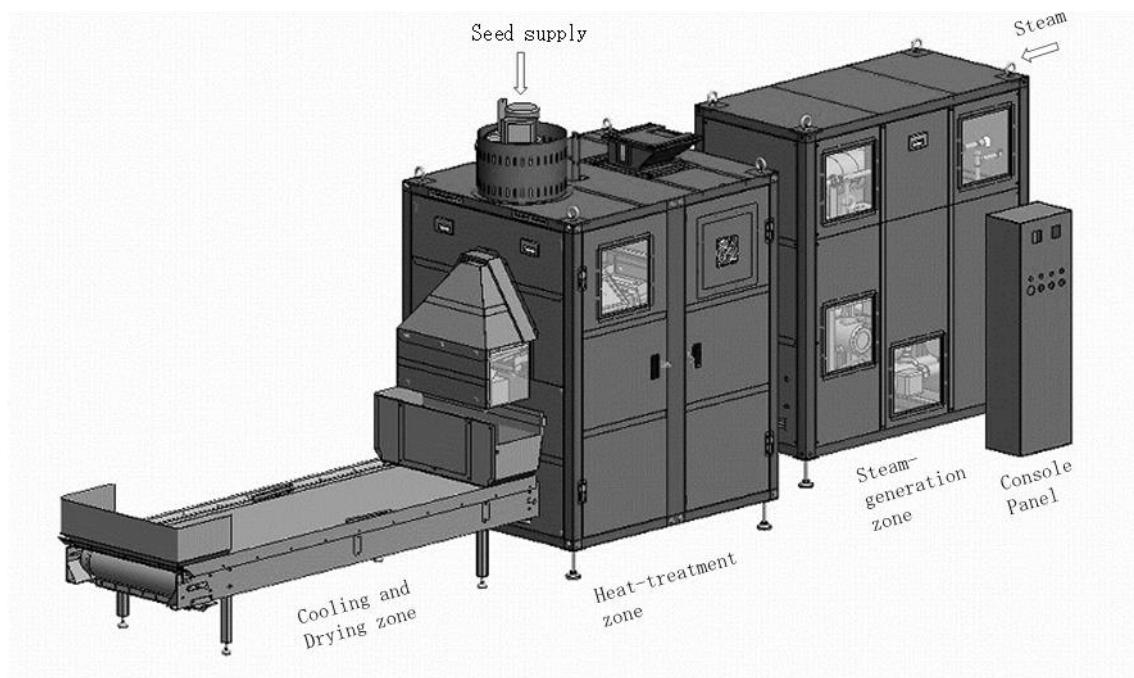


図 15 過熱水蒸気処理をおこなうフィーダ方式 4 号機 (生研センター開発)

蒸気生成部 (Steam-generation zone)は気流の温度、湿度および風量を制御して殺菌源となる高温高湿度の混合気体を生成する。熱処理部 (Heat-treatment zone)は蒸気生成部で調整した混合気体を水稻種子に連続的に曝露する部位である。本処理部内での種子の搬送は振動フィーダでおこなわれる。搬送板の一部は多孔板となっており、種子が多孔板上を移動する際に孔内を通過する混合気体に曝露する構造となっている。冷却・乾燥部 (Cooling and Drying zone)では加熱処理で凝縮水が付着し、高温となった種子を冷却および乾燥する。熱処理部から排出された種子を通気性のベルトコンベア上で薄く広げて常温で搬送しながら冷却および乾燥をおこなう。

本装置の蒸気生成物部では高温の過熱水蒸気と空気の混合割合を任意に調節することが可能で、種子に曝露した際の熱量を制御することができる。こうして生じた高温の混合気体が本装置の殺菌源となる。熱処理部における種子運搬には振動フィーダを採用しており、この振動によって種子は互いに重なり合うことなく多孔板上を通過することができる。上述の混合気体はこの多孔板から供給されるため、種子は混合気体に均一に曝露される。加熱処理後の種子は連続的に冷却・乾燥部へと運搬され、通気性のメッシュコンベヤ上に薄い層状に広がり、常温下でコンベヤ上を移動することで自然冷却および乾燥が完了する。以降、フィーダ方式4号機による熱処理から乾燥までの一連の処理を蒸気処理とする。

## (2)ばか苗病に対する殺菌効果

### 1) 供試種子

試験には、前年度にばか苗病が多発した圃場より採取した「はえぬき」の自然感染種子を用いた。供試種子から未熟種子を除去するため水選処理し、籾水分が約14%となるよう自然乾燥した後、試験区当たり20gを供試した。なお、フィーダ方式4号機で蒸気処理をおこなう際、種子量20gは過少で均一な熱処理ができないことから、供試種子と外観上識別できるように耐熱塗料 (No.2 ブラウン、オキツモ株式会社)で塗装した「つや姫」の種子1kgと混和した状態で蒸気処理した。

### 2) 処理方法

蒸気処理に用いた混合気体の乾球温度および湿球温度はそれぞれ200℃、92℃とし、供試種子が熱処理部を通過する曝露時間はそれぞれ5.4秒、6.6秒、7.4秒と異なる3条件とした。本条件は加熱処理直後の種子を360mL容の魔法瓶に満量回収し、密封状態で1分静置後に魔法瓶内部で測定した温度がそれぞれ73℃、75℃、77℃となる処理条件で、この値を穀温とする(表5、図16)。

表5 過熱水蒸気の処理条件

試験区	乾球温度 (°C)	湿球温度 (°C)	曝露時間 (秒)	種子処理量 (kg/h)	穀温 (°C)
73°C	200	92	5.4	100	73
75°C	200	92	6.6	100	75
77°C	200	92	7.4	100	77
温湯浸法	温湯浸法 (60°C・10分間)				
農薬	オキシリニック・プロクロラズ水和剤 (20倍・10分間)				
無処理	—				

乾球温度、湿球温度および曝露時間はそれぞれ、水稻種子に曝露した過熱水蒸気および高温空気の混合気体の熱条件、連続的な処理時間を示す。種子処理量は1時間あたりに本蒸気処理がおこなわれる水稻種子の量を示す。穀温は蒸気処理直後の種子を360 mL容の魔法瓶に満量回収し、密封状態で1分静置後に測定した同容器内の温度を示す。



図 16 穀温測定の様子 (生研センター測定)

左図：フィーダ方式 4 号機の熱処理部から排出される加熱処理直後の種子および自由落下する同種子を穀温測定用の魔法瓶へ採取する様子。

右図：上述の魔法瓶に満量まで種子を採取した後、温度センサーを付加したゴムキャップで同魔法瓶を密封し穀温を測定した。

なお、いずれの条件も、本装置の種子処理量は、1 時間あたり 100 kg に設定した。殺菌効果の対照区として、既存の消毒法である温湯浸法 (60℃、10 分間浸漬) および化学合成農薬のオキシリニック・プロクロラズ剤 (20 倍、10 分間浸漬) の処理区に加え、無処理区を設けた (表 5)。

### 3) 殺菌効果の確認

蒸気処理後の混和種子から供給種子のみを回収するため、汎用色彩選別機 (colorex, CLX-502DM, 株式会社山本製作所) を用いて混和種子の選別処理をおこなった。その後、回収した供試種子について、ばか苗病の殺菌効果を確認するため、供試種子を Fo-G2 培地にシャーレ当たり 50 粒置床し、25 °C で 10 日間培養した後、*Fusarium* 属菌のコロニー発生率を調査した。なお、試験は 3 反復で実施した。

### (3) 蒸気処理が種子発芽率に与える影響

#### 1) 供試種子

蒸気処理後の種子発芽率の確認試験には前年度産の健全な「はえぬき」種子を供試した。供試種子から未熟種子を除去するため、比重 1.13 の塩水選後に、籾水分が約 14 % となるよう自然乾燥させ、試験区当たり 20 g を供試した。なお、蒸気処理は上述と同様に、約 1 kg の混和種子の状態でおこなった。

#### 2) 処理方法

蒸気処理は上述の殺菌効果試験と同じ条件および試験区で実施した。

#### 3) 発芽率の確認

蒸気処理した混和種子からの供給種子の回収は、上述と同様に汎用色彩選別機を用いておこなった。回収した種子の発芽率の確認は、上述のプラズマ照射試験に準じて実施した。すなわち、蒸留水に 15 °C で 6 日間浸漬したのち、ろ紙を敷いて温室条件としたシャーレに任意の 100 粒を置床し、30 °C で 2 日間の催芽処理をした。その後、25 °C、16 時間日長の人工気象器内で培養し、播種から 5 日後及び 14 日後に、第 2 葉と根が生じたものを正常発芽として、発芽率を調査した。なお、試験は 3 反復とし、対照区及び無処理区は殺菌効果試験と同様に設けた。

#### (4) 蒸気処理後種子の育苗試験

##### 1) 供試種子

蒸気処理した水稻種子が正常に生育することを確認するため、山形県の奨励品種「はえぬき」「コシヒカリ」「ササニシキ」「あきたこまち」「ひとめぼれ」の粳5品種を対象に、育苗試験を実施した。それぞれの種子は発芽率試験と同様に、比重1.13の塩水選および籾水分を約14%に調整後に供試した。

##### 2) 処理方法

蒸気処理は各品種の1kgの種子を乾球温度200℃、湿球温度90℃、処理時間5.8秒、穀温75℃の条件で実施し、対照として市販の温湯種子消毒装置(YS-200L, 株式会社タイガーカワシマ)で同量の種子を温湯浸法(60℃、10分間浸漬)処理した区を設けた。各処理後の種子は慣行の育苗法に従い、浸種(10℃、7日間)、催芽(30℃、24時間)処理し、一般的に普及している育苗箱(30cm×60cm×4cm)に、箱当たり任意の種子120gを播種した。なお、培土は滅菌した水稻育苗培土(平成培土特号、片倉チッカリン株式会社)を用いた。播種後の育苗箱は出芽器(発芽機用ヒーター, C-110T, 株式会社タイショー)で加温出芽(30℃、3日間)処理したのち、育苗ハウスに運搬してプール育苗条件で管理した。なお、これらの育苗管理はいずれも農研センターの施設内で実施した。

##### 3) 苗乾物重の確認

水稻苗の生育調査はプール育苗開始から19日後に実施した。これは概ねの苗が一般的な移植に用いる生育ステージである稚苗となる時期にあたる。調査は育苗箱当たり任意の30本の苗を対象とし、それぞれの地上部乾物重を比較した。なお、試験区当たりの調査箱数はいずれも3箱とした。

## 2. 実験結果

### (1) ばか苗病に対する殺菌効果

蒸気処理のばか苗病に対する殺菌効果の調査結果を図17に示す。

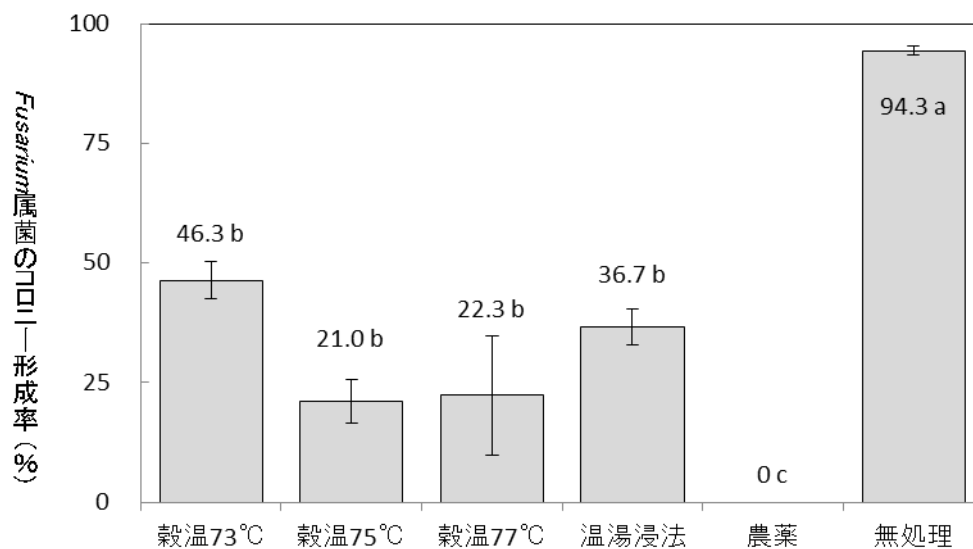


図 17 蒸気処理による種子消毒の殺菌効果

熱強度の異なる 3 条件の蒸気処理 (穀温 73 °C、75 °C、77 °C)をおこなったそれぞれの供試種子から任意の 50 粒を抽出し、Fo-G2 培地に置床して 20 °Cで 10 日間培養した。培養後、*Fusarium* 属菌に特徴的な褐色コロニーを形成した種子の割合を計測した。本試験は 3 反復実施し、対照として 60 °Cで 10 分間の温湯浸漬処理 (温湯浸法)、20 倍で 10 分間のオキシリニック・プロクロラズ水和剤 (農薬)および無消毒 (無処理)の試験区を設けた。図中の数値は 3 反復平均値、エラーバーは標準誤差をそれぞれ示す。アルファベットの同文字間には有意差がないことを示す (Tukey 法、 $p<0.05$ )。

無処理区における *Fusarium* 属菌のコロニー発生率は 94.3 % で、病原に重度に汚染した種子を用いた調査となった。蒸気処理のコロニー発生率は穀温 73 °C、75 °C、77 °C でそれぞれ、46.3 %、21.0 %、22.3 % で、いずれも農薬区の 0 % に劣ったが、温湯浸法区の 36.7 % と同等であった。

## (2) 蒸気処理が種子発芽率に与える影響

播種 5 日後および 14 日後の正常発芽率を図 18 に示す。播種 5 日後の正常発芽率は、穀温 73 °C、75 °C、77 °C でそれぞれ、68.3 %、75.0 %、69.0 % で、いずれも温湯浸法処理した 70.3 % と同等であった。また、播種 14 日後の正常発芽率は、穀温 73 °C、75 °C、77 °C でそれぞれ、92.3 %、95.0 %、91.7 % で、いずれも温湯浸法処理した 92.3 % と同等であった (図 18)。

## (3) 蒸気処理後種子の育苗試験

育苗試験の結果を図 19 に示す。穀温 75 °C で蒸気処理した種子を慣行栽培したところ、プール育苗開始から 19 日目の苗における地上部乾物重は、供試した「はえぬき」「コシヒカリ」「ササニシキ」「あきたこまち」「ひとめぼれ」の 5 品種すべてにおいて蒸気処理と温湯浸法との間に有意差は認められなかった。なお、調査時の苗について根張りの状況を確認したところ、蒸気処理および温湯浸法の苗はいずれの品種でも生育に差はみられなかった。



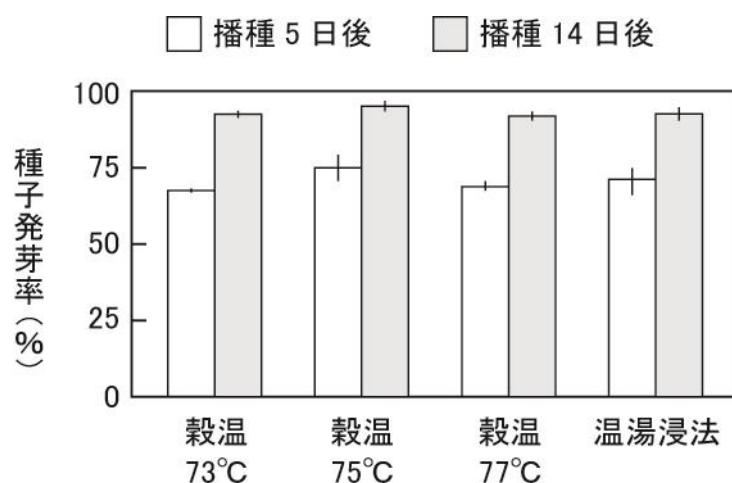


図 18 蒸気処理後の種子発芽率

前年度産の「はえぬき」健全種子 に熱強度の異なる3条件の蒸気処理 (穀温 73 °C、75 °C、77 °C)をおこない、蒸留水で浸種 (15 °C、6 日間)後に、ろ紙を敷いて温室条件としたシャーレに任意の 100粒を播種および催芽 (30 °C、2 日間)した。これを 25 °C で 16 時間明期の人工気象器内で培養し、播種から 5 日後または 14 日後に第 2 葉と根が生じたものを正常発芽として、発芽率を調査した。試験は 3 反復おこない、60 °C で 10 分間の温湯浸漬処理 (温湯浸法)で種子消毒した区を対照とした。数値は 3 反復平均値、エラーバーは標準誤差をそれぞれ示す。いずれの試験区間にも有意差は認められなかった (Tukey 法、 $p<0.05$ )。

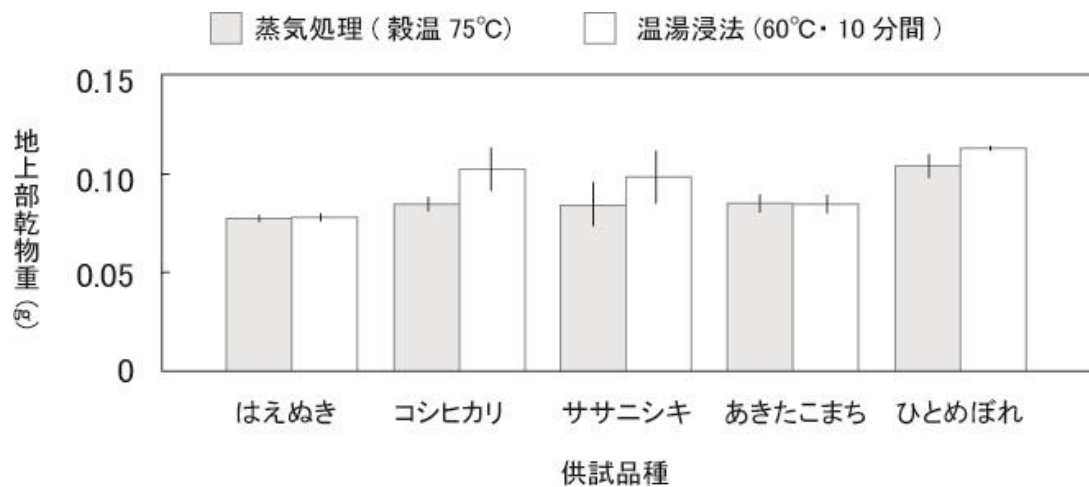


図 19 育苗開始から 19 日目における苗の地上部乾物重

前年度産の「はえぬき」「コシヒカリ」「ササニシキ」「あきたこまち」「ひとめぼれ」の健全種子それぞれに穀温 75℃の蒸気処理をおこない、浸種 (10℃, 7 日間) および催芽 (30℃, 24 時間) 処理後に、滅菌した育苗培土を充填した育苗箱 (30 cm×60 cm×4 cm) に箱当たり任意の種子 120 g を播種した。本育苗箱は出芽 (30℃、3 日間) 処理し、育苗ハウスで 19 日間のプール育苗条件で管理した。これらの苗から育苗箱あたり任意の苗 30 本について地上部乾物重を測定した。試験は品種あたり 3 反復おこない、温湯浸法 (60℃、10 分間) を対照とした。グラフは地上部乾物重の 3 反復平均値、エラーバーは標準誤差をそれぞれ示す。いずれの品種でも蒸気処理および温湯浸法とのデータ間に有意差は認められなかった (Tukey 法、 $p < 0.05$ )。

### 3. 考察

蒸気処理によるばか苗病の殺菌効果の検討に供試したばか苗病の自然感染種子は、無消毒の場合に *Fusarium* 属菌のコロニー発生率が 94.3 % と重度の汚染種子を用いた試験条件となった。オキシリニック・プロクロラズ水和剤を用いた種子消毒では *Fusarium* 属菌のコロニーが発生しなかったのに対し、3 条件の蒸気処理ではいずれもコロニーの発生が認められたことから、化学合成農薬と比較して殺菌効果が劣る結果となった。しかしながら、同コロニー発生率はいずれも、60 °C の湯に 10 分間浸漬した温湯浸法と同等で、現行の温湯浸法と同等の殺菌効果があると考えられた。

水稻品種「はえぬき」を用いた蒸気処理が種子発芽率に与える影響を室内試験で検討したところ、いずれの処理条件でも播種 5 日後および 14 日後の発芽率低下は認められず、実用可能な熱処理強度であることが明らかとなった。また粳品種 5 品種を対象とした実証規模の育苗試験においても、移植時期の苗の地上部乾物重は慣行の温湯浸法と同等の生育が確認された。

以上のように蒸気処理による種子消毒は、ばか苗病に対して 60 °C・10 分間の温湯浸法と同等の殺菌効果をもった代替技術としての実用性が認められた。さらに、温湯浸法で課題となっていた種子消毒コストについて比較すると、人件費を含むランニングコストは、温湯浸法が種子 1 kg あたり 26.2 円であるのに対し、蒸気処理は同 11.7 円と約 5 割の削減が示唆されている (野田ら、2015a)。また、温湯浸法の場合は種子消毒時の吸水に起因した種子保管時の病原の再感染リスクが報告されているが (井田と北澤, 2014)、蒸気処理の場合、処理後の籾は乾いた状態で装置から排出されるため、貯蔵前の乾燥工程の省略および病原体や雑菌等の繁殖リスクは低いものと考えられる。以上のことから、蒸気処理は低コストの温湯浸法の代替技術として適応性が高いと考えられる。

## II 種子浸漬水槽の衛生管理による感染抑制技術の開発

### 緒言

第 1 章のばか苗病の感染動態の調査において、育苗施設の一部では浸種および催芽工程で病原の感染が生じていることが確認された。この浸種または催芽工程におけ

る感染は病原体にとって好適な気象条件の場合、多発の要因となることが示唆されている（笹原, 2013）。また、生産現場では育苗施設の周辺環境に置かれた病原に汚染した籾殻、米ぬかおよび粉じんなどが伝染源となる病原飛散が疑われており（藤, 2013）、実際に宮城県の育苗施設内では空気中からの病原が検出されたことをうけ、種子消毒後に防除効果が継続する化学合成農薬と異なり、浸種および催芽時の浸漬水を介した感染が温湯浸法では課題となっている（藤ら, 2015）。

ここでは温湯浸法の補完防除技術として、浸種および催芽時の病原感染に対する防除技術の開発を目的とし、UV 照射試作機およびフィルターろ過を用いた浸種水の衛生管理によるばか苗病の防除効果について検討した。

## 1. 材料と方法

### (1) 装置概要

本試験には 15 L 容の水槽を用いた。本水槽に水循環用のポンプ (RMG-3000, Ryobi), 防塵用のフィルター (濾過精度 25 $\mu$ m, CSW-25, JNC Filter)、ウォーターヒーター (CV200, エヴァリス)およびウォータークーラー (ZC-100, Zensui)を設置し、水温 10  $^{\circ}$ C の浸種処理および水温 30  $^{\circ}$ C の催芽処理を連続的に実施できる循環式水槽とした。また、循環水の衛生管理機構として、UV 照射試作機 (テクノオリオカ株式会社) または、ろ過精度が 1  $\mu$ m のフィルター (CSW-1, JNC Filter, 以下、1  $\mu$ m フィルター) を用い、それぞれの機構を循環系に追設した (図 20)。

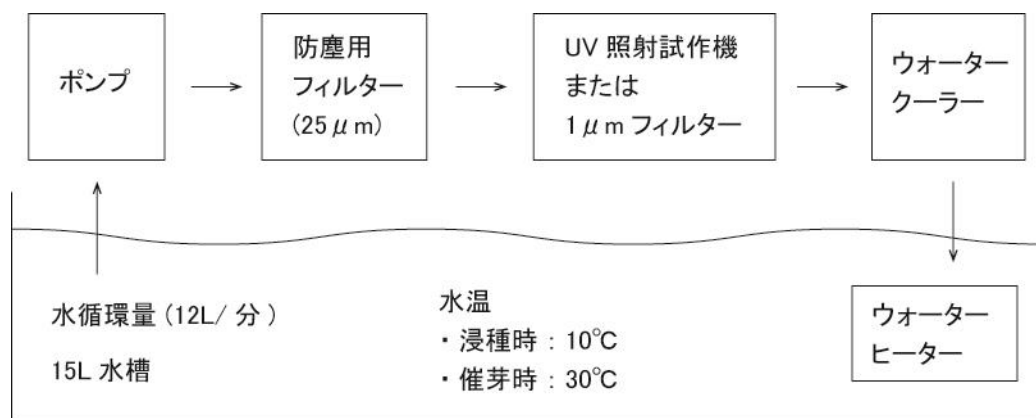


図 20 衛生管理機構を追設した浸種および催芽水槽の概要

循環式の水槽 (12 L/分) で、防除機構にあたる UV 照射試作機または 1  $\mu$ m フィルターは任意に設置が可能。循環系に設置したウォータークーラーおよびウォーターヒーターにより 10 °C の浸種および 30 °C の催芽が連続的に実施可能。図中の矢印は水循環の流れを示す。

上述の UV 照射試作機は、全照射光の約 10 %が 184.9 nm、約 90%が 254 nm の波長を生じる UV 管を光源としており、本光源に併設された石英管(直径 16 mm、長さ 230 mm)を水が通過する構造となっている。本装置の殺菌機作は、184.9 nm の UV 光が水と反応して生じるヒドロキシルラジカルの有機物分解能 (Peng *et al.*, 2015)および 254 nm の UV 光が保有する有機物分解能である (Haider *et al.*, 2002)。一方で 1  $\mu$ m フィルターは、病原体の小分生子 (5-12 $\times$ 1.5-2.5  $\mu$ m)より目合いの小さいフィルターを用いたろ過による物理的な病原体の除去を防除機作としている (Karov *et al.*, 2009)。

## (2) 供試種子

試験は 2015 年に実施し、水稻種子は前年度産の健全な「はえぬき」を用いた。これらの種子を比重 1.13 の塩水選後にメッシュバックに 3 kg を封入し、温湯浸法 (60℃、15 分間)で種子消毒をおこなって供試種子とした

## (3) 処理方法

上述の 15 L 容水槽に供試種子を入れ、浸種および催芽用の浸漬水には、ばか苗病菌の孢子懸濁液を供試した。本懸濁液は PDA 培地で 25 °C、7 日間培養した *F. fujikuroi* Ka52 株(MAFF244851)を用いて調製し、孢子濃度は  $1 \times 10^5$  個/mL とした。供試種子の浸種および催芽条件はそれぞれ 10℃で 7 日間、30℃で 24 時間とし、水交換は行わずに連続的に処理した。この浸種および催芽の期間中に殺菌処理として、UV 照射試作機による照射処理、または 1  $\mu$ m フィルターによるろ過処理を連続的におこない、病原の種子感染の有無について検討した。なお対照として無処理の試験区を設け、試験は 3 反復実施した。

## (4) 殺菌効果の確認

### 1) 保菌種子率

各処理の防除効果は浸種および催芽処理後の種子の保菌率から評価した。すなわち浸種または催芽処理後にそれぞれ試験区あたり 50 粒の種子を無作為に抽出し、100 mL の滅菌蒸留水で 3 回リンスした後、Fo-G2 培地に置床して 25℃で 7 日間、

人工気象器中で培養した。培養後、検体から生じたコロニーのうち、*Fusarium* 属菌に特有の鮭肉色のコロニーをばか苗病菌として、本コロニーを生じた種子数から、保菌種子率を算出した。

## (5) 種子発芽率への影響

### 1) 発芽率調査

上述の UV 照射およびフィルターろ過による処理が、種子発芽率に与える影響を調査した。本試験の浸種および催芽の浸漬水には水道水を用い、その他の供試種子、浸種および催芽条件等はいずれも、殺菌試験と同じ条件で実施した。浸種および催芽処理後の種子発芽率は、早坂ら (2001)を参考に実施した。すなわち、試験区あたり 100 粒の種子を無作為に抽出し、ろ紙を敷いたシャーレに播種後、25 °C、16 時間日長の湿室条件の人工気象器で培養し、播種 5 日後および 14 日後に、正常発芽した(第 2 葉と根が生じた)苗数から発芽率を算出した。また、試験期間中にシャーレ内の雑菌発生を抑制するため、灌水には 1000 倍希釈したオキシリニック酸・プロクロラズ水和剤を用いた。なお、対照として無処理区を設け、試験は 3 反復実施した。

## 2. 実験結果

保菌種子率および種子発芽率の調査結果をそれぞれ表 6、表 7 に示す。催芽処理後の保菌種子率は、無処理の 98.7 % に対し、UV 照射処理および、フィルター処理をした場合はいずれも 0 % で、病原の感染は認められなかった (表 6)。

また、播種 5 日後の発芽率は UV 照射処理、フィルター処理でそれぞれ 48.7 %、49.0 % で、いずれも無処理の 42.3 % と同等であった。同様に播種 14 日後の発芽率は、UV 照射処理、フィルター処理でそれぞれ 98.3 %、98.0 % で、いずれも無処理の 98.0 % と同等であった。

表 6 浸種および催芽後種子の保菌状況

試験区	保菌種子率 (%)			
	浸種後		催芽後	
UV照射	1.3 ±	0.7	0 ±	0
フィルターろ過	0 ±	0	0 ±	0
無処理	15.3 ±	2.7	98.7 ±	0.7

ばか苗病の病原体の孢子懸濁液 ( $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ) 15L 中で水稻種子を浸種 (浸種後) または浸種から催芽を連続処理 (催芽後) した後の種子保菌状況を調査した。本試験には同期間中に水槽の循環水 (孢子懸濁液) を UV 照射装置 (UV 照射)、1  $\mu\text{m}$  のフィルター (フィルターろ過) で処理した区および対照の無処理区を設けた。種子処理量は 3 kg とし、調査には任意の 50 粒を供試した。試験は 3 反復おこない、図中の数値は 3 反復平均値  $\pm$  標準誤差を示す。

表 7 播種 5 日後および 14 日後の種子発芽率

試験区	種子発芽率 (%)			
	播種5日後		播種14日後	
UV照射	48.7 ±	3.4	98.3 ±	0.3
フィルターろ過	49.0 ±	3.5	98.0 ±	1.0
無処理	42.3 ±	2.0	98.0 ±	1

水道水で浸種 (浸種後) または浸種から催芽を連続処理 (催芽後) した後の種子発芽率を調査した。本試験には同期間中に水槽の循環水を UV 照射装置 (UV 照射)、1  $\mu\text{m}$  のフィルター (フィルターろ過) で処理した区および対照の無処理区を設けた。種子処理量は 3 kg とし、発芽率は任意の 100 粒を抽出して調査した。試験は 3 反復おこない、図中の数値は 3 反復平均値  $\pm$  標準誤差を示す。いずれの試験区間にも有意差は認められなかった (Tukey 法、 $p < 0.05$ )。

### 3. 考察

UV 試作機または 1  $\mu\text{m}$  フィルターを利用した浸種および催芽期間中における種子の浸漬水の衛生管理は、ばか苗病の病原感染に対し高い抑制効果を示した。UV 試作機は 184.9 nm の UV 光を照射することで水中に発生するヒドロキシルラジカルの有機物分解能 (Peng *et al.* 2015) および 254 nm の UV 光照射が保有する有機物分解能 (Haider *et al.*, 2002) を殺菌機作として利用しており、大腸菌 (*Escherichia coli*) などに対する殺菌効果が既に知られているが (Salih. 2002、Giri *et al.* 2014)、上述の結果によってばか苗病に



対しても有効であることが明らかとなった。

また、ろ過精度 1  $\mu\text{m}$  のフィルター処理による病原の除去も、浸種および催芽期間中の病原感染の抑制に有効であることが明らかとなった。育苗施設における浸種または催芽用の水槽に対する病原の汚染については、施設内の空気伝搬が懸念されているが(鈴木と宮野, 2017)、本法のように水槽をフィルターろ過することで種子感染を抑制することが可能と考えられた。なお、本試験は現場と比較して比較的小規模な試験系であり、実用にはより大規模な装置および実証試験を要する。

## 総合考察

近年、水稻の生産現場では環境保全型農業の普及拡大をうけ、有機栽培や特別栽培などの農薬成分の使用回数が制限される栽培体系が広がりつつある。こうした栽培体系を実施する育苗現場では化学合成農薬による種子消毒法の代替として、熱を殺菌源とする温湯浸法が基幹技術となっている。一方で温湯浸法には防除コストや一部の育苗施設でばか苗病の多発がみられるなど、複数の課題が生じている。このため、ばか苗病の多発対策として一部の自治体では種子消毒を温湯浸法から化学合成農薬に戻す取組みも実施されている（鈴木, 2017）。本研究では温湯浸法に関連したこれら課題のうち、育苗期間中にばか苗病の感染が生じている工程および感染源の特定、プラズマ照射による温湯浸法の補完技術の開発、過熱水蒸気を利用した温湯浸法の代替技術の開発、浸種および催芽工程の追加防除法の開発を実施した。

ばか苗病の感染が生じている育苗工程の同定では、過去にばか苗病の多発事例があり種子消毒に温湯浸法を採用している育苗施設を対象に調査した。3 ヶ年の調査のうち、最初の 1、2 年目は慣行の育苗工程を浸種、催芽、出芽から 2.5 葉期までの 3 工程に分割したところ、調査地点 3 地点のいずれでも出芽開始から 2.5 葉期の期間で感染が認められた（表 2）。調査 3 年目はさらに詳細な感染動態を把握するため、浸種、催芽、出芽、出芽後から 2.5 葉期までの 4 工程について感染の有無を調査し、いずれの調査地点でも出芽開始から出芽完了までの期間に感染が生じていることを明らかにした（表 2）。よって、育苗期間中のばか苗病の防除において、出芽は特に重要な工程であると考えられた。一般的に出芽工程では均一な苗の出芽を促すため、育苗器を用いて約 30℃で 24 時間程度の加温処理が行われるが、育苗器の加温機構は蒸気加温であり、育苗器内は病原の感染に好適な高湿度で高温の環境条件となる。よって、出芽時の種子周辺に病原体が存在した場合、出芽期間中の加温処理が苗への感染を助長する要因となることが考えられる。

2013 年および 2014 年の調査では調査地点 3 地点のうち 2 地点（地点 A, C）では浸種および催芽時の感染は確認されなかったことから（表 2）、これら地点では催芽終了時までの育苗環境下に病原体は存在しなかったと考えられる。しかしながら、両地点ともに出芽開始から 2.5 葉期までの育苗期間中にばか苗病の感染が生じていることから、汚染種子以外の感染源がこの期間中に存在することが推察される。

いずれの育苗施設でも、出芽開始から導入される育苗資材は育苗箱であり、本資材がばか苗病の感染源となった疑いがあった。本研究で播種前の時期に任意の育苗箱を回収して病原の汚染の有無を調査したところ、いずれの育苗施設でも調査した育苗箱の4割以上から病原が検出された(表3)。聞き取り調査によれば、いずれの施設でも育苗箱の洗浄は水道水およびブラッシングのみで、薬剤を用いた殺菌は実施されておらず、育苗箱には培土および苗の残渣が目視できる状態であった。病原の *F. fujikuroi* は宿主に寄生しなくとも数年間生存することが知られており (Sunder and Satyavir, 1998)、常温の施設屋内で保管される育苗箱の表面でも、次回の作付け時期まで生存することが可能と考えられる。よって、前年度にばか苗病に罹病した苗残渣および汚染培土が付着した育苗箱が感染源となり、出芽工程における高温・高湿度の環境条件が感染の助長要因となったと考えられた。

また、もう一つの感染源として疑われた育苗器について病原の汚染の有無を調査した。いずれの育苗施設でも出芽終了時の育苗器の内側表面からも病原が検出されたが(表4)、これら病原の由来は出芽処理前から汚染していた育苗器によるものか、または汚染育苗箱から水蒸気を介して出芽期間中に汚染拡大したのかは不明であった。しかしながら、いずれの育苗施設でも病原の存在する状況下で出芽処理が実施されたことが示唆された。以上のことから、出芽時に感染するばか苗病の防除対策として、播種前に育苗箱や育苗器などの資材を既存の資材で消毒することが有効と考えられた。

温湯浸法だけでは防除効果が不十分な重度の汚染種子に対して、岩手県では化学合成農薬を複数年連用することで県全体の種子汚染程度を低減する技術を実施しており、宮城県でもこの対策を検討している(鈴木と宮野, 2017)。一方で、化学合成農薬の成分使用回数が制限される有機栽培や特別栽培など、環境保全型農業の継続を希望する生産現場からは化学合成農薬によらない温湯浸法の補完技術が求められている。本研究では温湯浸法で殺菌しきれなかった汚染種子に対する補完技術として、プラズマ照射の実用性を検討し、本処理が発芽率に影響せず(図11)に防除効果が得られることを確認した(図12)。これまでに水稻の種子消毒については乾熱空気や過熱水蒸気など(窪田ら, 2013、越智ら, 2015)、熱を殺菌源とする試みはあったが、種子発芽率への影響から一定以上の強度は実施できなかった。一方で従来の熱と異なる殺菌源であるプラズマ照射は温湯浸法の補完防除技術として親和性があり、大量の種子処理方法の開発という課題は残って

いるが、化学合成農薬によらない新たな種子消毒法として今後の実用が期待される。

温湯浸法は大量の湯を調製する燃料費に加え、種子浸漬、脱水および乾燥という3つの工程管理および単位あたりの消毒時間が10分以上という人的および時間的コストが課題であった。そこで、本研究では温湯浸法の代替技術として高温の過熱水蒸気を殺菌源とする種子消毒をおこなう試作機の実用性を検討した。本消毒法はばか苗病に対して同等の防除効果をもち(図17)、供試した「はえぬき」「コシヒカリ」「ササニシキ」「あきたこまち」「ひとめぼれ」の5品種では実用規模の処理でも種子発芽および苗生育に影響のないことを確認した(図18-20)。本法で蒸気処理した種子は乾燥した状態で処理装置から排出されることから、温湯浸法と異なり乾燥処理が省略可能となる。また、温湯浸法で報告されている水分含量の高い種子を保管した際に懸念されるばか苗病の再感染リスクも低減できると考えられる(井田と北澤, 2014)。さらに、人件費を含んだランニングコストを温湯浸法と蒸気処理で比較すると、前者では種子1 kgあたり26.2円なのに対し後者では11.7円で約5割の削減が可能とされている(野田ら, 2015a)。蒸気処理はばか苗病以外の種子伝染性病害虫に対しても、苗立枯細菌病、もみ枯細菌病および褐条病では温湯浸法と同等、ごま葉枯病およびイネシンガレセンチュウでは温湯浸法を上回る防除効果が確認されている(野田ら, 2015b)。一般的に温湯浸法は発芽率の低減要因となることから糯品種では採用されていないが、蒸気処理では糯品種への適応性が確認されていることから、実用場面はより広範になることが期待される(越智ら, 2013)。

育苗施設において空気などの育苗環境中に存在する病原体が感染源となる可能性が示唆されており(鈴木ら, 2017)、本調査でも一部の育苗施設では浸種および催芽工程における感染が認められ(表2)、環境中からの汚染が要因の一つとして疑われた。主な育苗工程である浸種および催芽はいずれも同一の大型水槽に種子を浸漬することから、一度ばか苗病の汚染を受けると被害規模が大きくなるため予防防除は重要である。そこで、浸種および催芽水槽に病原が混入した場合を想定して、浸漬水の衛生管理による感染防除技術の実用性について検討した。15L規模の水槽においてUV照射試作機およびろ過精度1  $\mu\text{m}$  のフィルターによる浸漬水の衛生管理処理は、菌密度が $1 \times 10^5$  個/mLという浸漬水の重度の汚染条件にも関わらず、浸種および催芽を連続的に実施した際、種子発芽に影響することなく(表7)、病原の感染を完全に抑止した(表6)。これらの技術の実

用化には各種防除機械の大型化および実証試験等が必要であるが、室内試験では高密度の病原に対して十分な防除効果が確認されており、空气中などの育苗環境に由来する比較的軽度の浸漬水槽の汚染に対しても実用性が期待される。

以上の知見を基に構築した、水稻の種子消毒から育苗における農薬を用いないばか苗病の体系防除の概要を図 21 に示す。

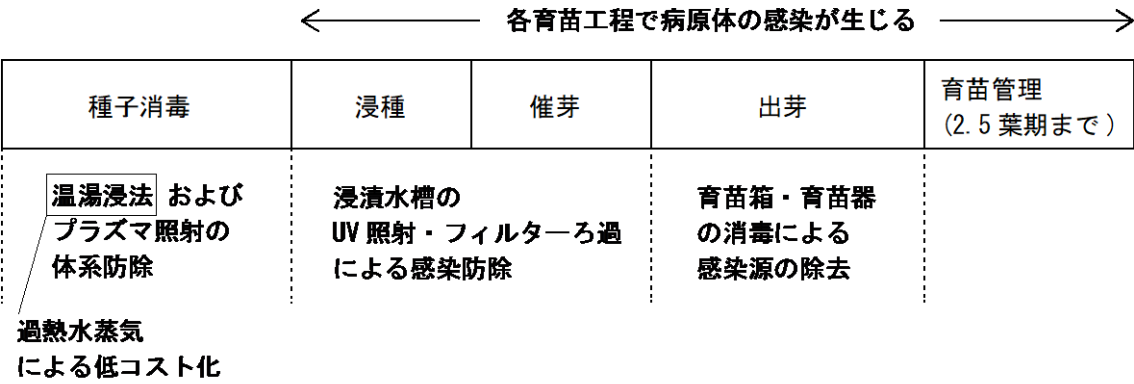


図 21 水稻育苗における農薬を用いないばか苗病の防除体系の概要

本研究で得た知見をもとに構築した水稻の種子消毒から 2.5 葉期までの育苗における、ばか苗病の防除体系の概要。種子消毒は温湯浸法およびプラズマ照射の体系で実施し、将来的には温湯浸法をより低コストな過熱水蒸気を利用した種子消毒法と代替する。浸種から 2.5 葉期までの 4 工程のいずれでも病原体の感染が生じることを明らかにした。このうち浸種および催芽は、種子の浸漬水槽を UV 照射またはフィルターろ過処理で衛生管理し、汚染種子および外部環境からの感染を防除する。出芽工程時の感染は、感染源の候補である育苗箱および育苗器を既存の消毒剤で衛生管理する。出芽後の育苗管理における感染の防除には、新たな研究開発を要する。

水稻の種子消毒においては、温湯浸法後にプラズマ照射を追加することで、現在懸念されているばか苗病に対する不安定な防除効果の補完防除が可能と考えられる。また、本研究では温湯浸法の低コストな代替技術として、過熱水蒸気を利用した種子消毒法を実用化している。よって、今後の検討が必要であるが、ここで検討した温湯浸法およびプラズマ照射の体系防除から、過熱水蒸気およびプラズマ照射の体系防除に代替することで、本種子消毒体系の低コスト化が期待される。

育苗現場の調査により、ばか苗病の感染は、浸種、催芽、出芽、育苗管理のいずれの育苗工程でも生じることが明らかになったことから、水稻の安定生産にはこれらすべての工程に対応した体系防除が必要と考えられる。育苗工程の最初の2工程である浸種および催芽は大量の種子を同一水槽内で処理するため、感染が生じた際の被害拡大が最も懸念される期間である。これに対し、上述のUV照射およびフィルターろ過は、これまで防除法のなかった浸漬および催芽時の浸漬水を介した病原体の感染防除に有効と考えられた。催芽に続く出芽は、育苗器内が30℃の高湿度条件となり、病原体の感染に好適な育苗工程である。実際、上述の現地調査では、すべての育苗施設で出芽時の感染が確認された。本調査では、育苗施設で使用している育苗箱および育苗器が感染源となった可能性を明らかにした。よって、これらの資材を従来の水洗でなく既存の消毒剤で衛生管理することで、各調査地点で確認した出芽時の感染リスクは低減できると考えられる。なお、出芽後の育苗管理工程で確認した感染の対策については、今後、新たな防除技術の開発が必要である。

以上のように上述の体系防除の実用には、複数の技術について大型施設に適した処理能力の向上などが必要である。しかしながら、本体系防除により、水稻の種子および苗を集約的に処理し、浸種から出芽までの工程を包括的に防除することが可能となり、現在問題となっているばか苗病の育苗ハウス単位での多発リスクを低減できると考えられる。

## 摘要

水稻の主要病害であるばか苗病は、糸状菌性の種子伝染性病害で、化学合成農薬による種子消毒が有効な防除法として知られている。一方、近年は環境保全型農業の拡大により、農薬の代替として種子消毒法である温湯浸法が基幹技術として普及している。温湯浸法は 60 ℃の湯に 15 分間種子を浸漬する熱殺菌手法であるが、育苗現場では複数の課題が生じている。本研究ではこの温湯浸法に関連した課題のうち以下 4 点を調査対象とした。1 点目の課題は例年ばか苗病が多発する育苗施設があること、2 点目はばか苗病に対する防除効果が不安定な懸念があること、3 点目は防除コストが高いこと、4 点目は浸種および催芽時における感染の懸念である。

1 点目の現地の育苗施設におけるばか苗病の常発に対し、本研究では育苗期間中における感染動態の解明を目的とした。育苗工程を浸種、催芽、出芽および 2.5 葉期までの育苗管理の 4 工程に分割して調査したところ、病原体の感染は 4 工程のいずれでも生じていることを明らかにした。特に、いずれの地点でも感染がみられる出芽は防除上重要な工程であると考えられた。また、感染源の調査では、各調査地点で管理している出芽前の育苗箱および出芽直後の育苗器それぞれの表面から病原体を検出した。よって、これら育苗施設におけるばか苗病の多発は、汚染した育苗箱および育苗器が感染源となり、出芽工程で感染したことに起因する可能性が示唆された。

2 点目の温湯浸法の不安定防除効果に対する懸念については、補完防除としてプラズマ照射を利用した体系防除法の構築を目的とした。ばか苗病の自然感染種子に温湯浸法とプラズマ照射とを体系処理したところ、選択培地上の処理後種子における病原体のコロニー形成を明らかに抑制した。また同体系処理は、処理後種子を育苗した際のばか苗病の発病苗率および発病程度を明らかに低減した。なお、本体系処理による水稻種子の発芽率低下は認められないことから、新たな種子消毒技術としての実用性が明らかとなった。この防除機作について検討したところ、プラズマ照射によって水稻種子内の  $H_2O$  がイオン化して産生した、過酸化水素を含む活性酸素種に由来することが推察された。

3 点目の課題である温湯浸法の高い防除コストに対し、本研究では過熱水蒸気を利用した種子消毒の代替技術の開発をおこなった。本法は高温の過熱水蒸気およ

び高温空気との混合気体を種子に数秒間曝露する熱消毒法である。ここでは、ランニングコストが温湯浸法の2分の1以下となる実用装置（フィーダ方式4号機）について実用性試験をおこなった。本装置による蒸気処理は、ばか苗病の自然感染種子に対して温湯浸法（60℃、10分間）と同等の防除効果を示した。また本処理による種子の発芽率および苗生育への影響は認められず、本装置の実用性が明らかとなった。

4点目の課題である浸種および催芽時における感染に対し、本研究では浸種および催芽時の種子の浸漬水をUV照射試作機またはフィルターろ過で衛生管理する技術の開発をおこなった。これら防除機構を追設した循環式の15L容の水槽を用い、浸漬水を病原体の孢子懸濁液に置換して、健全種子の浸種および催芽を連続的におこなったところ、いずれの防除機構でも病原体の感染は認められなかった。また、本処理による種子の発芽率への影響は認められず、その実用性が明らかとなった。

以上の本研究で得た知見を体系化すると、ばか苗病に対して種子消毒から出芽完了時までの連続した防除が可能となる。すなわち、種子消毒では温湯浸法およびプラズマ照射の体系で安定した防除効果が得られる。また今後の検討を要するが、本種子消毒体系は、温湯浸法を過熱水蒸気に代替することで低コスト化が期待される。種子消毒に続く浸種および催芽では、UV照射試作機またはフィルターろ過により、浸漬水の病原体による汚染が防除される。催芽に続く出芽では、本工程の感染源の可能性が高い、育苗箱および育苗器の消毒により、従来よりも感染リスクの低減が可能と考えられる。この包括的な育苗体系の実用にはさらなる検討および技術開発が必要であるが、生産現場からの要望の高い環境保全型農業を継続しながら、水稻の安定生産に寄与するものと考えられる。



## 引用文献

- Bennett, J. W. and Klich, M., (2003). Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 16: 497–516.
- Cumagun, C. J. R., Arcillas, E., Gergon E, (2011). UP-PCR analysis of the seedborne pathogen *Fusarium fujikuroi* causing bakanae disease in rice. Int. J. Agric. Biol. 13: 1029-1032.
- 藤晋一 (2013). 化学農薬を用いない水稻種子消毒法の普及による諸問題とその対策, 植物防疫 67: 223-227.
- 藤晋一、工藤学、佐々木南海 (2015). イネばか苗病菌の薬剤感受性が種子消毒の効果に及ぼす影響と農家施設のモニタリング, 秋田県立大学ウェブジャーナル B 2: 181-186.
- Geiser, M. D., del Mar, M., nez-Gasco, J., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kulda, G. A. and O'Donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Eur. J. Plant Pathol. 110: 473-479.
- Giri, R., Ozaki, H., Guo, X., Takanami, R. and Taniguchi, S. (2014). Significance of water quality and radiation wavelength for UV photolysis of PhCs in simulated mixed solutions. Cent. Eur. J. Chem. 12: 659-671.
- Haider, T., Sommer, R., Knasmüller, S., Eckl, P., Pribil, W., Cabaj, A. and Kundi, M. (2002). Genotoxic response of Austrian groundwater samples treated under standardized UV (254 nm)-disinfection conditions in a combination of three different bioassays. Water Res. 36: 25-32.
- 早坂剛、石黒清秀、渋谷圭治、生井恒雄 (1999). イネ種子伝染性病害に対する恒温水槽による温湯浸法. 日植病報 65: 667.
- 早坂剛、石黒清秀、渋谷圭治、生井恒雄 (2001). 数種のイネ種子伝染性病害を対象とした温湯種子消毒. 日植病報 67: 26-32.
- 林かずよ、小山淳、石川志保、城所隆 (2002). イネ種子伝染性病害に対する物理的・耕種的防除法. 宮城古川農試報 3: 137-147.
- Hayashi, N., Yagyu, Y., Yonesu, A. and Shiratani, M. (2014). Sterilization characteristics of the surfaces of agricultural products using active oxygen species generated by atmospheric plasma and UV light. Jpn. J. Appl. Phys. 53, 05FR03.
- 洞口博昭、沼田芳宏、折坂光臣 (2008). 温湯浸漬処理した水稻種子の長期保存条件. 東北農業研究. 61: 33-34.

- 井田陽介、北澤健 (2014). 温湯消毒後にイネばか苗病菌を増殖させない水稻種子の乾燥および保管方法. 滋賀農技セ特研報 52: 41-49.
- 伊與田浩志, 井上保 (2014). 過熱水蒸気を利用した乾燥と加熱. 冷凍. 1045: 13-18.
- Jones, J. B., McCarter, S. M., Smitley, D. R. (1981). A vacuum infiltration inoculation technique for detecting *Pseudomonas* tomato in soil and plant tissue. Ame. Phytopathol. Soc. 71: 1187-1191.
- 金田尚也、戸田武、古屋廣光、藤晋一 (2011). イネばか苗病菌の種子予措中の動態. 日植病報 77: 209 (講演要旨).
- Karov, I., Mitrev, S., Kostadinovska, E. (2009). *Gibberella fujikuroi* (Sawada) wollenweber, The new parasitical fungus of rice in the republic of Macedonia. J. Nat. Sci. Matica Srpska. 116: 175-182.
- Komada, H. (1975). Development of a selective medium for qualitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Rev. Plant Pro. Res. 8, 114-125.
- 窪田陽介、小林研、越智昭彦、酒井和彦、吉永慶太、中山夏希、石綿陽子 (2013) 乾熱空気による水稻種子消毒技術の開発, 農業機械学会誌 75: 259-267.
- 黒田克利、富川章、鈴木啓史、鈴木素弘 (2005). 1 回当たり 80 kg の種もみを処理できる温湯浸法消毒装置の開発. 三重科技セ農研報 31: 1-6.
- Laroussi, M., Alexeff, I. and Kang, W. L. (2000). Biological decontamination by nonthermal plasmas. IEEE Trans. Plasma Sci. 28: 184-188.
- Lu, Q., Liu, D., Song, Y., Zhou, R. and Niu, J. (2014). Inactivation of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* by an atmospheric-pressure cold plasma jet. Plasma Process. Polym. 11: 1028-1036.
- Luo, Q. Z., D'Angelo, N. and Merlino, R. L. (1998). Shock formation in a negative ion plasma. Phys. Plasmas 5: 2868-2870.
- Nishimura, N. (2007) Selective media for *Fusarium oxysporum*. J. Gen. Plant Pathol. 73: 342-348.
- 野田崇啓、日高靖之、伊與田浩志、越智昭彦、酒井和彦、薮哲男、上垣陽平、三室元気、守川俊幸、磯田淳、星野滋、有江力、中村透、軽部勇希 (2015a). 水蒸気の凝縮熱を利用した環境保全型水稻種子消毒装置の開発 (第 1 報)、農業食料工学会誌 77: 371-383

- 野田崇啓、日高靖之、越智昭彦、酒井和彦、藪哲男、上垣陽平、守川俊幸、三室元気、磯田淳、星野滋、有江力、伊與田浩志、辻岡哲夫 (2015b). 高能率種子消毒装置の開発. 生研センター研究報告会講演要旨: 15-27.
- 岡部繭子、馬場正、陶山一雄 (2009). 日本における水稻種子温湯消毒の普及について. 日作紀. 78: 515-517.
- Peng, Z., Day, D. A., Stark, H., Li, R., Lee-Taylor, J., Palm, B., Brune, W. H. and Jimenez, J. L. (2015). HOx radical chemistry in oxidation flow reactors with low-pressure mercury lamps systematically examined by modeling. *Atmospheric Meas. Tech.* 8: 4863-4890.
- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview. *Int. J. Food Microbiol.* 119: 3-10.
- Salih, F. M. (2002). Enhancement of solar inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *J. Appl. Microbiol.* 92: 920-926.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 笹原教子 (2013). 育苗管理方法がイネばか苗病の発生に及ぼす影響. 宮城古川農試報 11: 85-92.
- Sasaki, S., Kanzaki, M. and Kaneko, T. (2014). Highly efficient and minimally invasive transfection using time-controlled irradiation of atmospheric pressure plasma. *Appl. Phys. Express* 7: 026202, 1-4.
- Shimizu, T., Nosenko, T., Morfill, G. E., Sato, T., Schmidt, H.U. and Urayama, T. (2010). Characterization of low-temperature microwave plasma treatment with and without UV light for disinfection. *Plasma Process. Polym.* 7: 288-293.
- Sunder, S. and Satyavir, S. (1998). Survival of *Fusarium moniliforme* in soil, grains and stubbles of paddy. *Indian Phytopath.* 51: 47-50.
- 鈴木智貴 (2017). 温湯浸漬処理後の水稻種子におけるイネばか苗病菌感受性と育苗工程のリスク評価, 宮城古川農試報 12: 73-80.
- 鈴木智貴、宮野法近. (2017). 水稻の種子予措をおこなう作業場環境からのイネばか苗病菌の検出. 宮城古川農試報 12: 67-72.
- 鈴木智貴、笹原教子、笹原剛志 (2013). イネばか苗病の保菌数低減を目的とした本田期

- 防除薬剤の探索と薬剤散布手法の検討. 宮城古川農試報 11: 77-84.
- Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J. and Leprince, P. (2006). Atmospheric pressure plasmas. *Spectrochimica Acta Part B: Atom. Spectrosc.* 61: 2–30.
- Torres, M. A., Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141: 373-378.
- Webster, R. K. and Gunnell, P. S. (1992). *Compendium of Rice Diseases*. St Paul, MN, USA: APS Press.
- Zainudin, N. A. I. M., Razak, A. A. and Salleh, B. (2008). Bakanae diseases of rice in Malaysia and Indonesia: Etiology of the causal agent based on morphological, physiological and pathogenicity characteristics. *J. Plant Protect. Res.* 48: 475-484.
- Zhang, X., Liu, D., Zhou, R., et al. (2014). Atmospheric cold plasma jet for plant disease treatment. *Appl. Phys. Lett.* 104, 043702.

## 謝辞

本研究に際してご指導ご鞭撻をいただき、また本論文のご校閲の労を賜りました東北大学大学院 農学研究科教授 高橋英樹博士に心より感謝申し上げます。次に、研究および試験のご指導、ご助言を頂きました同研究科 安藤杉尋博士、宮下脩平博士に心より感謝申し上げます。次に、試作機の製作および共同研究の機会を頂きました、東北大学大学院 工学研究科 金子俊郎博士その他同研究科の皆様、農研機構生物系特定産業技術研究支援センター野田崇啓博士、日高靖之氏の他、同センターの皆様、(株)山本製作所の中村透博士、軽部勇希氏、佐々木孝氏、後藤恒義氏の他、(株)山本製作所の皆様、大阪市立大学大学院 工学研究科教授 伊與田浩志博士の他、同研究科の皆様、テクノ・モリオカ株式会社の森岡雄一氏、川名隆弘氏の他テクノ・モリオカ株式会社の皆様、山形大学大学院理工学研究科 遠藤昌俊博士の他同研究科の皆様、現地調査に協力頂いた生産者の皆様に心より感謝申し上げます。最後に、研究の遂行にご尽力頂きました、山形県農業総合研究センターの皆様に心より感謝申し上げます。